

**Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

DISSERTATION

**Experimentelle Untersuchungen zur neuronalen
Fehlregulation des Zellzyklus beim Schlaganfall**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

Juri Katchanov

aus Moskau, Russische Föderation

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Haberl, München
2. Prof. Dr. med. O. Witte, Jena
3. PD Dr. med. M. Endres, Berlin

Datum der Promotion: 25.04.03

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1. Einleitung	3
1.1 Schlaganfall	3
1.2 Schlaganfallmodelle	4
1.3 Verzögerter neuronaler Zelltod nach Ischämie	4
1.4 Zellzyklus	5
1.5 Synthetischer Zellzyklusinhibitor Olomoucine	11
1.6 Dysregulation des Zellzyklus als Auslöser des neuronalen Zelltodes	12
1.7 Zellzyklusregulation und Ischämie	14
2. Herleitung der Aufgabenstellung und experimentelle Strategie	15
3. Methodik	17
3.1 Material	17
3.1.1 Basispuffer	17
3.1.2 Fixativa	17
3.1.3 Antikörper	17
3.1.4 Sera	18
3.1.5 Zellkultur	18
3.2 Methoden	18
3.2.1 Filamentmodell	18
3.2.2 BrdU-Applikation	19
3.2.3 Primäre neuronale Zellkultur	19
3.2.4 Sauerstoff-Glukose-Entzug	20
3.2.5 Vorbehandlung der Zellkultur mit Olomoucine	21
3.2.6 Gewebeaufarbeitung	21
3.2.6.1 Transkardiale Fixation des Gewebes	21
3.2.6.2 Einfrieren von unfixierten Maushirnen	21
3.2.6.3 Schneiden und Lagerung des Gewebes	21
3.2.7 In Situ-Markierung der nukleären DNA-Fragmentation	22
3.2.7.1 TUNEL mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromagen	23
3.2.7.2 TUNEL mit Fluorescein als Chromogen	23
3.2.8 Immunhistochemie	24

3.2.8.1	Doppelfärbungen gegen TUNEL und Zellmarker	24
3.2.8.2	Immunhistochemie gegen verschiedene striatale Neurone	24
3.2.8.3	Immunhistochemie gegen Zellzyklusmarker	26
3.2.8.4	Doppelfärbungen gegen Zellzyklusmarker und neuronale Marker	27
3.2.8.5	Immunhistochemie gegen BrdU	27
3.2.8.6	Doppelfärbungen gegen TUNEL und BrdU	28
3.2.8.7	Immunzytochemie in Zellkultur	28
3.2.9	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	29
3.2.10	Konfokale Mikroskopie	29
3.2.11	Western Blotting	30
3.2.12	Histon-Kinase-Assay	31
3.2.13	Elektronenmikroskopie	31
3.2.14	Zellzählprotokolle	32
3.2.15	Statistik	33
4.	Ergebnisse	34
4.1	Charakterisierung des Modells der milden fokalen zerebralen Ischämie	34
4.2	Expression von Zellzyklus-relevanten Proteinen im intakten adulten Maushirn	38
4.3	Untersuchung von Zellzyklusproteinen nach milder Ischämie	38
4.3.1	Expression des CDK-Inhibitors p16 ^{INK4a} in Neuronen im ischämischen Striatum	38
4.3.2	Expression von Cyclins D1 im ischämischen Striatum.	41
4.3.3	BrdU-Inkorporation in die DNA als Marker der S-Phase	41
4.3.4	Detektion von BrdU-positiven Neuronen	42
4.3.5	Detektion von BrdU- und TUNEL-positiven Zellen	43
4.4	<i>In vitro</i> -Experimente	44
4.4.1	Expression der Zellzyklusproteine <i>in vitro</i>	44
4.4.2	Schadensmodelle <i>in vitro</i>	44
4.4.3	Expression von CDK-Inhibitoren in Neuronen nach OGD	45
4.4.4	Expression von Cyclin D1 nach OGD	45
4.4.5	Katalytische CDK-Aktivität nach OGD	46
4.4.6	Pharmakologische Studien mit Olomoucine	47

5.	Diskussion	48
5.1	Zentraler Befund	48
5.2	Einordnung des Befundes in die Biologie von postmitotischen Neuronen	49
5.3	Einordnung des Befundes in die Pathologie des neuronalen Zelltodes	50
5.3.1	CKI-Verlust als initiierendes Ereignis	50
5.3.2	Nukleäre Expression von Cyclin D1 als weiterer CDK-aktivierender Schritt	52
5.3.3	CDK-Aktivierung nach Hypoxie	52
5.3.4	DNA-Replikation als Hinweis für Eintritt in die S-Phase	53
5.3.5	Protektive Wirkung des Zellzyklusinhibitors Olomoucine nach Hypoxie	55
5.3.6	Zellzyklusaktivierung als Bestandteil neuronaler Todeskaskaden	56
5.3.7	Beteiligung aberranter Zellzyklusaktivierung bei weiteren ZNS-Erkrankungen	58
5.4	Schlaganfall-Therapie	60
6.	Zusammenfassung	63
7.	Publikationen	64
7.1	Originalarbeiten	64
7.2	Abstracts	64
7.3	Weitere Publikationen	65
8.	Literaturverzeichnis	66
9.	Atlas der Farbabbildungen	79
	Danksagung	100
	LEBENS LAUF	101
	Eidesstattliche Erklärung	105

Abkürzungen

ATP	Adenosin-Triphosphat
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxy-Uridin
CD	"cluster of differentiation"
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
ChAT	Cholin-Azetyl-Transferase
CKI	CDK-Inhibitor
CON	Kontrolle
cpm	"counts per minute"
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat
FISH	Fluoreszenz-in Situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
FKS	fetales Kalbserum
GFAP	„glial fibrillary acid protein“
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure
HPF	"high-power"-Feld
HRP	Meerrettich-Peroxidase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPF	"low-power"-Feld
MCA	A. cerebri media
MCAo	Okklusion der A. cerebri media
NeuN	„neuron-specific nuclear protein“
NGF	Neuronaler Wachstumsfaktor „nerve growth factor“

OGD	Sauerstoff-Glukose-Entzug
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	“phosphat buffered saline”
pRb	Retinoblastom-Gen-Protein
Rb	Retinoblastom-Gen
SDS	Natriumdodezyl-Sulphat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBS	“Tris buffered saline”
TBST	“Tris buffered saline” mit Triton X
TdT	terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling
UTP	Uridin-Triphosphat
Veh	Vehikel

1. Einleitung

Diese Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung von Zellzyklusvorgängen in Neuronen nach experimenteller fokaler transienter zerebraler Ischämie in der Maus. Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Beantwortung der Frage, ob eine Fehlregulation des Zellzyklus einen Schadensmechanismus des verzögerten neuronalen Zelltodes oder aber ein Zeichen der Regeneration darstellt. Darüber hinaus ist die Absicht dieser Studie herauszufinden, ob pharmakologische Zellzyklusinhibition einen protektiven Effekt nach Schlaganfall aufweist und somit potentiell in der akuten Schlaganfallbehandlung ihren Einsatz finden könnte.

1.1 Schlaganfall

Trotz zurückgehender Indizienz bleibt der Schlaganfall in den industrialisierten Ländern immer noch dritthäufigste Todesursache (110 pro 100.000/ Jahr). Die jährliche Inzidenz des Schlaganfalls in Deutschland beträgt 30 pro 100.000 im Alter bis 44 Jahren und 1230 pro 100.000 im Alter über 75 Jahre. Insgesamt erkranken in der Bundesrepublik z.Z. ungefähr 150 000 Einwohner pro Jahr neu an einem Schlaganfall (Poeck und Hacke, 1998). Die ungünstige Prognose und die damit verbundene hohe sozioökonomische Bedeutung des Krankheitsbildes ist nicht nur durch die hohe Mortalität, sondern auch durch bleibende Behinderung bedingt. Dabei bleiben etwa 30% aller Patienten auf Dauer schwerbehindert und auf die Hilfe Dritter angewiesen (Berlit, 2000). Man nimmt an, daß allein in Deutschland rund 800 000 Menschen an den Folgen eines Schlaganfalls leiden (Poeck und Hacke, 1998).

Mit ca. 80% bildet die fokale zerebrale Ischämie die häufigste ätiologische Ursache des Schlaganfalls (Fisher, 1951; Victor und Ropper, 2001). Durch die Erforschung der dabei ablaufenden Schadensmechanismen ergeben sich therapeutische Ansätze, die eine kausale Behandlung des Schlaganfalls ermöglichen könnten.

1.2 Schlaganfallmodelle

Um die bei einer fokalen zerebralen Ischämie stattfindenden pathophysiologischen Vorgänge zu untersuchen sowie experimentelle Interventionen zu testen, wurden *in-vivo*- und *in-vitro*-Modelle des Schlaganfalls entwickelt.

In-vivo-Modelle des ischämischen Schlaganfalls basieren auf operativen Okklusionen extra- und intrakranieller Arterien. Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie konnten u.a. in Primaten (Hudgins und Garcia, 1970; Garcia und Kamijyo, 1974), Hunden (Molinari, 1970), Ratten (Brint et al., 1988; Zea Longa et al., 1989) und Mäusen (Huang et al., 1994; Endres et al., 1998) etabliert werden. Eines der häufig eingesetzten Modelle der fokalen transienten zerebralen Ischämie ist das Filamentmodell in der Maus, bei welchem zum Gefäßverschluß ein Faden in die A.cerebri media eingebracht und nach erfolgtem Gefäßverschluß nach einem gewissen Zeitraum wieder entfernt wird.

Als ein *in vitro*-Modell des Schlaganfalls wurde Ende der 80er Jahre von Choi und Kollegen das Verfahren des kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Entzuges (*oxygen glucose deprivation*, OGD) in der kortikalen neuronalen Zellkultur entwickelt (Goldberg and Choi, 1990; Goldberg und Choi, 1993). Kultivierte neuronale Zellen werden dabei transient in desoxygeniertem, glukosefreiem Medium inkubiert. Auf diese Art und Weise wird *in vitro* der Mangel von Sauerstoff und Glukose im Gehirn bei einem ischämischen Schlaganfall simuliert. Seit der Erstbeschreibung wurde dieses Modell gut charakterisiert und auf weitere Neuronenpopulationen erweitert (Bruer et al., 1997; Ruscher et al, 1998; Kalda et al., 1998).

1.3 Verzögerter neuronaler Zelltod nach Ischämie

Experimentelle Studien ließen vier prinzipielle Schadensmechanismen der fokalen zerebralen Ischämie auskristallisieren: Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität, Perinfarkt-Depolarisationen, Entzündung und programmierter Zelltod (Dirnagl et al., 1999). Dabei tritt der neuronale Zelltod teilweise verzögert ein (Garcia et al., 1995; Du et al., 1996; Endres et al., 1998). Eine besondere Bedeutung kommt dem Konzept der Penumbra zu. Gegenwärtige Vorstellung ist, daß nach Eintreten eines zerebralen Gefäßverschlusses sich eine Grenzzone (Penumbra) eines prinzipiell

wiederbelebbares Gehirngewebe ausbildet (Hossmann, 1994; Ginsberg und Pulsinelli, 1994; Fisher und Garcia, 1996). Diese Zone weist noch eine Restperfusion auf, und die Zellen damit einen Restmetabolismus. Wahrscheinlich ermöglicht gerade dieser erhaltene Metabolismus das -teilweise aberrante- Anschalten von unterschiedlichen Programmen und Kaskaden, die verzögerte Schadensmechanismen darstellen.

Viele von diesen Kaskaden, insbesondere die Aktivierung von Caspasen, übernehmen wahrscheinlich als gemeinsame Endstrecken ("downstream"-Mechanismen) die formale Exekution des zellulären Todes ("Caspase-abhängiger Zelltod" nach Moskowitz; Namura et al., 1998; Fink et al., 1998; Thornberry und Lazebnik, 1998).

1.4 Zellzyklus

Die initiiierenden Vorgänge, die am Anfang des verzögerten neuronalen Zelltodes stehen, sind noch nicht ausreichend identifiziert. In jüngster Zeit häufen sich Hinweise darauf, daß nach Ischämie *in vivo* bzw. nach Sauerstoff-Glukose-Entzug *in vitro* eine Aktivierung bzw. Wiederexpression von Zellzyklus-relevanten Genen stattfindet. Es scheint, als würden im Ischämiegebiet (und insbesondere im Bereich der Penumbra) ontogenetische Programme wieder angeschaltet, die man physiologischerweise in den Neuronen sonst nur während der Embryonalentwicklung findet (Cramer und Chopp, 2000). Unter diesem Aspekt erscheint die Regulation und –ggf. Dysregulation- des eukaryonten Zellzyklus, welcher in den adulten Neuronen klassischerweise als komplett sistierend angesehen wurde (Tixier-Vidal, 1994), pathophysiologisch relevant.

Der Zellzyklus wird per Konvention in 4 Phasen unterteilt: Die G1-Phase (von „gap“, Lücke), in der die Zelle sich auf die DNA-Synthese vorbereitet, die S-Phase (von „DNA-Synthese“), während der die DNA-Replikation stattfindet, die G2-Phase, in der Vorbereitungen für die Mitose getroffen werden, und die M-Phase (von „Mitose“). Nach der Mitose kann die Zelle entweder in die Ruhephase G0 übergehen oder sich terminal differenzieren. Klassischerweise wird angenommen, daß eine terminal differenzierte Zelle die Eigenschaft für immer verliert, wieder in den Zellzyklus eintreten zu können (sog. „postmitotische“ Zelle), während eine in der G0-

Phase befindliche Zelle diese Fähigkeit noch beibehält. Der Zellzyklus kann prinzipiell zwischen der G₁- und S-Phase und zwischen G₂- und M-Phase angehalten werden („G₁- und G₂-arrest“), die jeweiligen Übergänge werden daher als „checkpoints“ bezeichnet. Die Entscheidung der Zelle, in die S-Phase einzutreten, findet am sog. R-Punkt („Restriktionspunkt“) statt, welcher sich spät in der G₁-Phase am G₁→S-Übergang befindet (Pardee, 1989; Zetterberg et al., 1995). Ist dieser Punkt überwunden, wird das Programm der DNA-Replikation angeschaltet (Abb. 1).

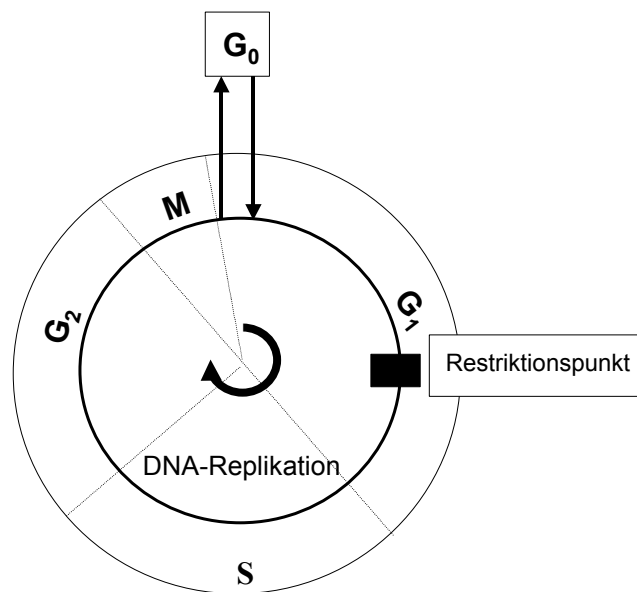


Abb. 1: Schematische Darstellung der 4 Phasen des Zellzyklus

Im Zentrum des molekularen Apparates, der den Zellzyklus reguliert, stehen 3 Typen von Molekülen: Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen („cyclin-dependent kinases“, CDK) und CDK-Inhibitoren (CKI). Per Konvention werden in Säugerzellen Vertreter der Cyclin-Familie mit Großbuchstaben (A,B,C, etc), Moleküle aus der CDK-Familie mit Ziffern (CDK1, CDK2, etc) und CKIs nach ihrem molekularen Gewicht sowie dem Protein kodierenden Gen ($p15^{\text{INK4b}}$, $p16^{\text{INK4a}}$, etc) bezeichnet. Die phasenspezifische Interaktion dieser 3 Großfamilien ist für einen regelrechten Ablauf des Zellzyklus verantwortlich. Die Proteine der Cyclin-Familie besitzen eine ca. 100 Aminosäuren-lange Homologie, auch „cyclin box“ genannt, durch welche sie die CDKs binden und aktivieren (Denhardt, 1999; Puri et al, 1999). Die CDKs sind eine Familie von Serin-Threonin-Kinasen, die bzgl. Größe und Sequenz nahe verwandt

sind. Sie werden – im Gegensatz zu Cyclinen- nahezu stets im Überschuß in der Zelle synthetisiert. In ihrer monomeren Form sind sie inaktiv. Kristallographische Untersuchungen zeigten, daß erst die Bindung der sog. PSTAIRE-Region der CDK an die „cyclin box“ des Cyclins eine Konformationsveränderung der CDK herbeiführt, in welcher ATP für die Phosphorylierung des Substrats zugänglich wird (Puri et al., 1999). Aktivierte CDKs phosphorylieren weitere Bestandteile der Zellzyklusmaschinerie und bewirken dadurch die Zellzyklusprogression.

Zwei prinzipielle Mechanismen scheinen für die phasenspezifische Aktivierung und Wirkung der CDKs verantwortlich zu sein. Zum einen werden die jeweiligen Cycline zeitlich begrenzt nur in spezifischen Abschnitten des Zellzyklus synthetisiert. Zum anderen können aktive Cyclin-CDK-Komplexe ihre Wirkung nur im Nukleus entfalten, so daß die subzelluläre Lokalisation der Cycline eine weitere Regulationsmöglichkeit des Zellzyklus darstellt (Yang und Kornbluth, 1999). Im Zytoplasma werden Cycline Ubiquitin-abhängig proteolytisch abgebaut. Auf diese Art und Weise bleiben Cycline zyklusphasenspezifisch nur kurzzeitig aktiv und können somit die Funktion der „Schrittmacher“ des Zellzyklus übernehmen. Die Eigenschaft der Cycline, nur während bestimmter Perioden des Zellzyklus transient im Nukleus der Zelle vorhanden zu sein, macht sie ebenfalls zu geeigneten zeitlichen Markern der Zellzyklusprogression (Johnson und Walker, 1999).

Wenn die Zelle aus der Ruhephase in den Zellzyklus eintritt ($G_0 \rightarrow G_1$), werden zuerst ein oder mehrere D-Cycline (D1, D2, D3) synthetisiert. Die Expression unterschiedlicher Subtypen der D-Cycline scheint dabei zellspezifisch zu sein (Sherr, 1993). Dabei stellen die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 die katalytischen Partner der D-Cycline dar. Die katalytische Aktivität der D-Cyclin-CDK4/6-Komplexe wird zuerst in der mittleren G_1 -Phase manifest und erreicht ihr Maximum kurz vor dem $G_1 \rightarrow S$ -Übergang (Sherr, 1994). Die D-Cycline können direkt an das Retinoblastomprotein („protein of retinoblastoma gene“, pRb) binden, so daß sie auf diese Art und Weise die CDK4 zu ihrem Substrat „lotsen“. Das Retinoblastomprotein liegt in der ruhenden Zelle nicht phosphoryliert vor und verhindert in diesem aktiven unphosphorylierten Zustand als „Bremse des Zellzyklus“ (Cotran et al., 1995) bzw. „Wächter des Restriktionspunktes“ (Weinberg, 1995) den Übergang in die S-Phase. Das unphosphorylierte Retinoblastomprotein bindet und inaktiviert nämlich die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, welche den Eintritt der

Zelle in die S-Phase vermitteln (Pardee, 1989; Sherr, 1994; Black und Azizkhan-Clifford, 1999). Nach der Phosphorylierung durch CDK4 werden Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie aus der Bindung an pRb freigesetzt und aktiv (Abb. 2, s. Seite 12).

Bei der weiteren Progression in die S-Phase am späten G1→S-Übergang wird Cyclin E exprimiert, welches CDK2 aktiviert. Die CDK2-Cyclin E-Komplexe phosphorylieren sowohl pRb (sog. „Hyperphosphorylierung“) als auch essentielle Bestandteile der DNA-Replikationsmaschinerie, wodurch sie aktiviert werden. Bereits in der S-Phase wird das Cyclin A gebildet, welches mit CDK2 und CDK1 katalytisch aktive Holoenzyme bildet. Während die CDK2-Cyclin A-Komplexe ebenfalls für die Aktivierung der DNA-Replikation zuständig sind, treiben die CDK1-Cyclin A-Komplexe die Zelle in die G2- und später in die M-Phase. Die Expression von Cyclin B1 unterstützt –durch Bildung von aktiven CDK1-Cyclin A-Komplexen– den Eintritt in die M-Phase (Johnson und Walker, 1999).

Eine weitere wichtige Regulationsweise der CDK-Aktivität besteht in der Bindung von niedermolekularen CDK-Inhibitoren (CKIs) an den CDK-Cyclin-Komplex. Es werden 2 Familien mit jeweils biochemischen und funktionellen Homologien unterschieden: die Cip-Kip-Familie (CDK *inhibitory* polypeptides, *Kinase inhibitory proteins*), die als universelle bzw. unspezifische CDK-Inhibitoren alle CDKs der G1-Phase hemmen, und die INK4-Familie (*inhibitors of CDK4*), die als selektive und spezifische CDK-Inhibitoren CDK4 und CDK6 inhibieren (Vidal und Koff, 2000). Die Cip-Kip-Familie beinhaltet p21^{WAF1/Cip1} (der als erstes entdeckte CKI), p27^{Kip1} und p57^{Kip2}; zur INK-Familie gehören p15^{INKb}, p16^{INK4a}, p17^{INK4c} und p19^{INK4d}. Die Mechanismen der inhibitorischen Wirkung dieser Proteine werden zunehmend klarer. Die Andockung von p27^{Kip1} an den CyclinA-CDK2-Komplex induziert eine Konformationsänderung, die u.a. die Affinität der Kinase für ATP reduziert (Puri et al., 1999). p16^{INK4a} scheint dagegen direkt die Aktivität von CDK4 bzw CDK6 zu inhibieren, indem es einen binären Komplex mit diesen Kinasen ohne Cyclin –und somit ohne katalytische Aktivität– bildet (Serrano et al., 1995). Es bestehen Hinweise, daß p16^{INK4a} die Cyclin D-Bindung kompetitiv hemmt (Puri et al., 1999). Zusätzlich kann p16^{INK4a} die Aktivität der Cyclin D-CDK4-Komplexe am pRb inhibieren. Unabhängig von den jeweiligen Mechanismen der CDK-Inhibition wurde sowohl für p27^{Kip1} als auch p16^{INK4a} gezeigt, daß die alleinige Überexpression eines dieser CKIs

den Zellzyklusarrest herbeiführen kann (Toyoshima und Hunter, 1994; Puri et al., 1999).

CKI sind weiterhin beteiligt am Zellzyklusausstieg, Einleitung der Zelldifferenzierung sowie Erhaltung („maintainance“) des postmitotischen Zustandes einer terminal differenzierten Zelle (Puri et al., 1999). *In vitro* ist die zelluläre Akkumulation von p16^{INK4a} mit dem Eintritt der Zelle in die Seneszenz verbunden, dem Zustand des permanenten Zellzyklusarrestes, in welchem die Zelle gegenüber mitogenen Stimuli refraktär bleibt (Huschtscha und Reddel, 1999). Umgekehrt weisen Zellkulturen mit zerebellären Körnerzellvorläufern (sog. CGP-Zellen: cerebellar granular precursors), die aus der p27-defizienten (p27^{-/-}) Maus gewonnen wurden, im Vergleich zu p27^{+/-} Kulturen eine deutlich gesteigerte Proliferation mit einem späteren Ausstieg aus dem Zellzyklus auf (Miyazawa et al., 2000). *In vivo* wurden p16^{INK4a} und p27^{Kip1} im Rattenzerebellum sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen identifiziert, wobei die Anzahl der p16^{INK4a}- bzw. p27^{Kip1}-positiven Zellen zwischen dem postnatalen Tag 6 bis ins Erwachsenenalter stieg (Watanabe et al., 1998, Shambaugh et al., 2000, Miyazawa et al., 2000). Zerebella von p27^{-/-} -Mäusen sind signifikant zellreicher als die von p27^{+/-} -Mäusen, die wiederum in der Anzahl der Zellen die Zerebella des Wildtypes (p27^{+/+}) überragen (Miyazawa et al., 2000). Eine deutliche Zunahme der p16^{INK4a}-mRNA in vielen Organen in Maus einschließlich des Gehirns zwischen der 4. und 15. Woche der postnatalen Entwicklung lässt eine mögliche Beteiligung dieses CKI an Differenzierungsprozessen vermuten (Zindy et al., 1997a, 1997b). Allerdings bleiben die Regulation des Zellzyklusausstiegs und vor allem die Mechanismen, welche diesen Zustand aufrechterhalten, noch weitgehend unverstanden (Ross, 1996; Caviness et al., 1999). Insbesondere ist die funktionelle Bedeutung der Expression der CKIs im adulten Gehirn -insbesondere im Bezug auf die Aufrechterhaltung des postmitotischen Zustand- nicht ausreichend geklärt (Legrier et al., 2001).

Eine Übersicht über die wichtigsten Zellzyklusproteine gibt die Tabelle 1 (modifiziert nach Puri et al., 1999):

Tabelle 1:

Zellzyklusprotein	Phase des Zellzyklus	Funktion
Cyclin D (D1,D2,D3)	G1-Phase	Aktivierung von CDK4 und CDK6
Cyclin E	Progression in die S-Phase	Aktivierung von CDK2
Cyclin A	späte S-Phase	Aktivierung von CDK2 und CDK1
Cyclin B	Progression die M-Phase	Aktivierung von CDK1
CDK4	G1-Phase	Phosphorylierung vom pRb
CDK6	G1-Phase	Phosphorylierung vom pRb
CDK2	Progression in die S-Phase	Phosphorylierung der DNA-Replikations-Maschinerie
CDK1	Progression in die M-Phase	Phosphorylierung vom Histon H1
p16 ^{INK4a}	G1-Phase	Inhibition vom CDK4
p27 ^{Kip1}	G1-Phase	Inhibition von CDK4, CDK2

Die Abbildung 2 gibt die Vorgänge der Zellzyklusregulation schematisch wieder (modifiziert nach Funk und Kind, 1997; Yang und Kornbluth, 1999):

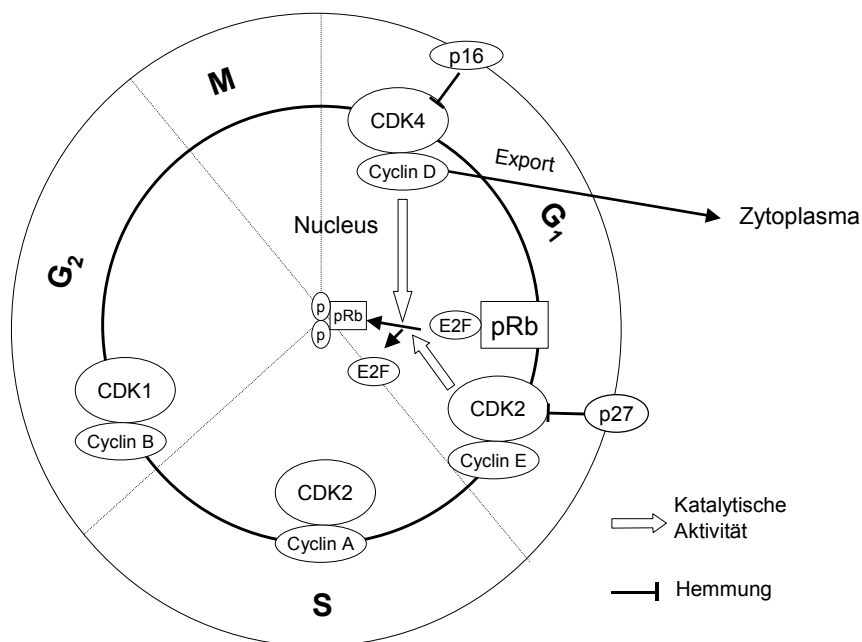


Abb. 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus

1.5 Synthetischer Zellzyklusinhibitor Olomoucine

Bei der Untersuchung der Wirkung von unterschiedlichen Purinanaloga auf die CDKs entdeckten tschechische Wissenschaftler aus der Stadt Olomouc die kompetitive Inhibition der CDK2 und CDK1 durch 2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin (Vesely et al., 1994). Sie gaben diesem Purinanalogon den Namen Olomoucine (Abb. 3).

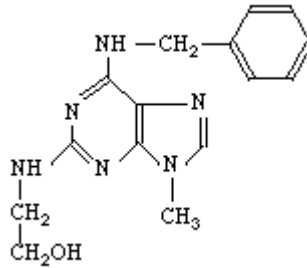


Abb. 3: Chemische Struktur von Olomoucine

Die kinetische Analyse der Kinaseninhibition zeigte, daß Olomoucine die Bindung vom ATP kompetitiv hemmt. Der IC_{50} -Wert, d.h. die Konzentration, bei der die katalytische Aktivität um 50% reduziert wird, beträgt für CDK2-Cyclin E-, CDK2-Cyclin A-, CDK1-Cyclin A-Komplexe jeweils 7 μ M (Vesely et al., 1994). Zelluläre Effekte von Olomoucine auf im Zellzyklus befindliche Zellen sind gut charakterisiert: Durch die Inhibition der CDK2-Cyclin E-Komplexe wird der Zellzyklus in der G1-Phase angehalten („G1-arrest“) (Abraham et al., 1995, Abb 4).



1.6 Dysregulation des Zellzyklus als Auslöser des neuronalen Zelltodes

Die Vorgänge der Zellteilung und des Zelltodes erscheinen auf den ersten Blick entgegengesetzt sowohl in ihrer funktionellen als auch möglichen pathophysiologischen Bedeutung. In letzter Zeit häufen sich jedoch Hinweise, daß beide Prozesse mechanistisch miteinander verknüpft sind. Die Maus mit einem defekten Retinoblastoma-Gen stirbt während der pränatalen Entwicklung vor dem 16. embryonalen Tag und zeigt eine massive Zunahme des apoptotischen Zelltodes im Bereich der ventrikulären Zone, welche einen natürlichen Ort der Neubildung der Neurone darstellt (Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992; Clarke et al., 1992). Zugrundegehende Zellen werden dabei in der unmittelbaren Nähe zu ektopischen Mitosen beobachtet. Basierend auf diesen Daten stellten Lee und Kollegen die Hypothese auf, daß die Ausreifung der Neuroblasten mit einem Ausstieg aus dem Zellzyklus einhergeht. Dieser Vorgang wird durch Aktivität des Retinoblastoma-Proteins geregelt und ist somit von der Intaktheit des Retinoblastoma-Gens (Rb) abhängig. Ist dieser Prozess durch die Funktionsunfähigkeit des Rb-Proteins beeinträchtigt, können die Neuroblasten in den Zellzyklus wieder einsteigen, was allerdings zum zellulären Tod führt (Lee et al., 1992, Lee et al., 1994).

Die Untersuchung des neuronalen Zelltodes *in vitro* lieferte weitere Hinweise auf die Bedeutung der Expression von Zellzyklus-assoziierten Genen in postmitotischen Neuronen. Die Deprivation einer Zellkultur der sympathetischen Neuronen der Ratte (aus dem Ganglion cervicale superior) vom neuronalen Wachstumsfaktor NGF stellt ein zuverlässiges und extensiv beschriebenes Modell des programmierten Zelltodes bei postmitotischen Neuronen dar (Martin et al., 1992). In diesem Modell zeigten Johnson und Kollegen auf mRNA-Ebene eine selektive Expression des G₁-Phasen-Markers Cyclin D1 in den untergehenden Neuronen (Freeman et al., 1994).

Weitere Evidenzen, die die Hypothese bestätigten, daß ein Wiedereinstieg in den Zellzyklus einen Mechanismus des Zelltodes in postmitotischen Neuronen darstellen könnte, erbrachten die Untersuchungen des Phänotyps der *staggerer*-Maus (*sg/sg*). Die *staggerer*-Mutante ist charakterisiert durch einen frühen postnatalen Zellverlust in der inferioren Olive und Zerebellum: Alle zerebellären Körnerzellen gehen im Laufe des ersten postnatalen Monats zugrunde (Herrup und Mullen, 1979). Herrup und Busser zeigten, daß diese postmitotischen Zellen unmittelbar vor ihrem Untergang DNA synthetisieren und den G₁-Phasen-Marker Cyclin D1 sowie „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) exprimieren. Die Autoren konnten also sowohl auf Proteinebene (Expression von Zyklusphasenmarker) als auch DNA-Ebene (DNA- Neusynthese) belegen, daß diese Zellen in der S- bzw frühen G₂-Phase sterben (Herrup und Busser, 1995).

Die Bedeutung der Zellzyklusdysregulation als Ursache des neuronalen Todes von postmitotischen Neuronen wurde dann in *in vitro*-Protektionsstudien verdeutlicht. Park und Kollegen zeigten im Schadensmodell des Entzugs vom neuronalen Wachstumsfaktor NGF (NGF-Deprivation), daß die Applikation des synthetischen CDK-Inhibitor Olomoucine den neuronalen Tod fast vollständig verhindert (Park et al., 1996). Bald darauf wies diese Arbeitsgruppe die protektive Wirkung von synthetischen CDK-Inhibitoren *in vitro* in Modellen der Camptothecin- und K⁺-Entzugs- induzierten neuronalen Apoptose (Park et al., 1997b; Padmanabhan et al., 1999) nach. Die Überexpression von CDK-Inhibitoren p16^{INK4a} und p27^{Kip1} sowie die Inhibition von Cyclin D-CDK4- und Cyclin D-CDK6-Komplexe durch die Überexpression von nicht funktionierendem (sog. „dominant-negativen“) CDK4 und 6 schützte die Neurone ebenfalls vor dem apoptotischen Tod (Park et al., 1997a).

1.7 Zellzyklusregulation und Ischämie

Die Expression von Zellzyklusproteinen im Bereich der Ischämie wurde in mehreren tierexperimentellen Modellen des Schlaganfalls festgestellt: Cyclin D1 im Kortex nach der permanenten fokalen zerebralen Ischämie in Maus (Guègan et al., 1997), Cyclin D1, Cyclin A, CDK2 und CDK4 im Kortex nach der transienten fokalen cerebralen Ischämie in der Ratte (Li et al., 1997, 1998), Cyclin D1 im Hippocampus nach der globalen cerebralen Ischämie in der Ratte (Timsit et al., 1999) sowie Cyclin D1 und CDK4 in den Vorderhornneuronen nach der transienten Ischämie des Rückenmarkes in Kaninchen (Sakurai et al., 1999). Die Frage, ob die Expression dieser Moleküle einen aberranten Zellzyklus widerspiegelt, wird allerdings kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite werden die Zellzyklusmoleküle in den ischämischen Neuronen exprimiert, die morphologische oder biochemische Merkmale des -z.T. erst beginnenden- zellulären Todes wie nukleäre Kondensation und oligonukleosomale DNA-Fragmentation aufweisen (Guègan et al., 1997; Sakurai et al., 1999). Auf der anderen Seite werden diese Proteine ebenfalls in (noch) intakt aussehenden Neuronen im ischämischen Bereich einschließlich Penumbra exprimiert (Li et al., 1997, 1998). Die Expression von diesen vor allem während der Embryonalentwicklung bedeutsamen Proteinen könnte dann einen potentiell protektiven Mechanismus darstellen, der diese Neurone vor dem ischämischen Zelltod schützt. Basierend auf diese Beobachtung stellten Chopp und Kollegen die Hypothese auf, daß die Zellregeneration nach ischämischem Schaden die Wiederholung einer frühen Entwicklungsstufe miteinbezieht. Die Expression von embryonalen Proteinen in der Penumbra könnte dann zu einem gewissen Grad einen aktiven Prozeß anzeigen, welcher das Überleben der Neurone fördert (Li et al., 1997, 1998; Cramer und Chopp, 2000).

2. Herleitung der Aufgabenstellung und experimentelle Strategie

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung der Zellzyklusaktivierung nach transienter fokaler Ischämie zu analysieren. Trotz mehrerer Hinweise auf die Beteiligung von Zellzyklusproteinen am neuronalen Zelltod nach unterschiedlichen Noxen *in vitro* und *in vivo*, war die Frage ungeklärt, ob die Expression von diesen Proteinen nach Ischämie einen kausalen Schadensmechanismus (Guègan et al., 1997; Sakurai et al., 1999) oder aber ein Zeichen der Regeneration (Li et al., 1997, 1998; Cramer und Chopp, 2000) darstellt. Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Beantwortung dieser Frage liegt daran, daß die zu einem bestimmten Reperusionszeitpunkt erhobenen Daten lediglich eine Momentaufnahme der dynamischen, z.T. parallel ablaufenden Vorgänge der De- und Regeneration darstellen. Diese Momentaufnahme erlaubt keine funktionelle Aussage bezüglich der Entscheidung „schädlich“ versus „regenerationsfördernd“. Allein die zeitliche und räumliche Beziehung der Expression der Zellzyklusmaschinerie zu Markern des neuronalen Todes kann kausal-pathogenetische Hinweise liefern. Ein wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit war also, die kausale Beziehung zwischen der Expression von Zellzyklusproteinen und neuronalem Tod nach transienter fokaler Ischämie in der Maus herauszuarbeiten.

Folgende 5 Aufgabenstellungen wurden zu Beginn der Arbeit formuliert:

1. zeitliche und räumliche Charakterisierung des neuronalen Zelltodes in unserem Modell der 30-minütigen fokalen („milden“) Ischämie;
2. Untersuchung der Expressionsmuster von Zellzyklus-relevanten Molekülen im intakten Mausstriatum;
3. Bestimmung des zeitlichen Verlaufes der neuronalen Expression von Zellzyklus-relevanten Molekülen nach 30-minütiger fokaler Ischämie;
4. Untersuchung der Zellzyklusprogression in ischämischen Neuronen, insbesondere im Hinblick auf einen möglichen Eintritt in die S-Phase;
5. Untersuchung möglicher protektiver Effekte vom synthetischen Zellzyklusinhibitor Olomoucine nach Ischämie/ Hypoxie, um die Kausalität zwischen der Zellzyklusaktivität und neuronalem Zelltod zu eruieren sowie Ansatzpunkte für interventionelle Maßnahmen aufzudecken.

Unserer Hypothese nach wird die Zellzyklusaktivität intakter adulter Neurone aktiv inhibiert. Um die Faktoren ausfindig zu machen, die diese Aktivität hemmen, wurde die Expression von zellzyklusinhibierenden CKIs im intakten Mausgehirn untersucht. Der Wegfall von inhibierenden bzw. die Neuexpression von aktivierenden Molekülen könnte dann die Wiederaktivierung des Zellzyklus erklären. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bestand also darin, die für diese Reaktivierung zuständigen Faktoren herauszufinden.

Es wurden parallel die transiente Ischämie *in vivo* (30-minütige Okklusion der A. cerebri media mit Reperfusion [MCAo]) und Hypoxie *in vitro* (Sauerstoff-Glukose-Entzug [OGD]) als experimentelle Schlaganfallmodelle eingesetzt. Methodisch wurde die Expression von Zellzyklus-relevanten Molekülen auf der Proteinebene mittels Immunhistochemie (Immunfluoreszenz und DAB) und Western-Blotting untersucht. Die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) wurde mittels Histon-Kinase-Assay radiographisch bestimmt. Die Progression in die S-Phase wurde mit Hilfe der Inkorporation des Thymidinanalogons 5-Bromo-2'-Desoxy-Uridin (BrdU) immunhistochemisch sowie elektronenmikroskopisch nachgewiesen.

3. Methodik

3.1 Material

3.1.1 Basispuffer

PBS (0.1 M, pH 7.4, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe), TBS (10 mM, pH 8.0, Sigma, Taufkirchen), TRIZMA (0.1 M, Sigma).

Die Zusammenstellung aller weiteren speziellen Puffer wird im jeweiligen Teil der Methoden beschrieben.

3.1.2 Fixativa

4 % Paraformaldehyd (Sigma) in PBS (pH=7.2-7.4), Glutaraldehyd (Sigma).

3.1.3 Antikörper

Anti-p16 (M-156), anti-p27 (C-19), anti-Cyclin D1 (C-20), anti-Cyclin E (M-20), anti- Cyclin A (C-19), anti-Cyclin B1 (M-20), anti-CDK2 (C-22), anti-CDK4 (C-22) und anti-Aktin wurden von der Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg) bezogen. Folgende kommerziell erhältliche Zellmarker wurden eingesetzt: Neuronale Marker anti-MAP2 (MAB3418) und anti-NeuN (MAB377) von der Fa. Chemicon International GmbH (Hofheim), mikroglialer Marker anti-MAC-1 (=anti-CD11b, MCA711) von der Fa. Serotec GmbH (Düsseldorf) und astroglialer Marker anti-GFAP (M0761) von der Fa. DAKO GmbH (Hamburg). Anti-BrdU (Mas 250p) wurde von der Fa. Harlan Sera-Lab (Belton, UK) bezogen. Die Antikörper gegen striatale Projektions- und Interneurone (anti-Substanz P, anti-Neurokinin B, anti-L-Enkephalin, anti- μ -Opioid-Rezeptor, anti-Cholin-Acetyl-Transferase, anti-Calretinin, anti-Somatostatin und anti-Parvalbumin) wurden freundlicherweise von Herrn Prof.Dr.R.W.Veh (Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Charite, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Folgende sekundäre Antikörper wurden kommerziell erworben: HRP-konjugierter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (RPN2108) von der Fa. Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig), biotinylierte anti-Maus-IgG-Antikörper (BA-9200), anti-Ratte-IgG-Antikörper (BA-4001) und anti-Kaninchen. IgG-Antikörper (BA-1000) von der Fa. Vector (Vertrieb Alexis Deutschland GmbH, Grünberg), TexasRed-

konjugierte anti-Maus-IgG (T-6390) und anti-Kaninchen-IgG (T-6391), AlexaFluor-488-konjugierte anti-Maus-IgG (A-11001) und anti-Kaninchen-IgG (A-11008) von der Fa. Molecular Probes (Leiden, Niederlande). Das Standard-Avidin-Biotin-Kit für DAB-Immunhistochemie Vectastain ABC-Peroxidase-EliteKit (VC-PK-6100) wurde von der Fa. Vector (Vertrieb Alexis Deutschland GmbH, Grünberg) bezogen, das TexasRed-gekoppelte Streptavidin (S-872) von der Fa. Molecular Probes (Leiden, Niederlande).

3.1.4 Sera

Folgende Sera wurden eingesetzt: fetales Kalbserum (Sigma), normales Kaninchenserum, normales Ziegenserum, normales Pferdeserum (alle von der Fa. Vector, Vertrieb Alexis Deutschland GmbH, Grünberg).

3.1.5 Zellkultur

Neurobasales Medium und Zusatz B27 wurden von der Fa. Life Technologies/BRL (Eggenstein) bezogen, modifiziertes Eagle-Medium, HEPES-Puffer, Trypsin/EDTA, Penizillin-Streptomycin, L-Glutamin, Kollagen G und Poly-L-Lysin von der Fa. Biochrom (Berlin). Proteinase-Inhibitoren-Cocktail wurde von der Fa. Boehringer Mannheim (Mannheim) bezogen.

Die Herkunft aller weiteren hier nicht erwähnten Reagenzien wird im Text des Methodenteiles (3.2) angegeben.

3.2 Methoden

3.2.1 Filamentmodell

Die Tierexperimente wurden in strenger Richtlinie zu den gültigen Tierschutzbestimmungen in Zusammenarbeit mit PD Dr. M. Endres durchgeführt (Tierversuchsantrag-Antrag Nr. G0054/99). Alle operativen Eingriffe wurden an tief anästhesierten Tieren vorgenommen. SV129 Mäuse (Taconic Farms, Germantown, USA; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin) wurden mit Halothan im N₂O-O₂-Gasgemisch (70 % N₂O und 30% O₂) anästhesiert. Die Narkose wurde mit 1.5% Halothan eingeleitet und mit 1.0 % fortgesetzt. Fokale zerebrale Ischämie wurde mit einem monofilen Nylonfaden, der mit einem Silikon-Resin-Gemisch beschichtet wurde, induziert. Der Faden wurde in

die linke A. carotis interna bis zum Abgang der A. cerebri anterior am Circulus Willisii eingeführt. Auf dieser Art und Weise wurden A. cerebri media und A. choroidea anterior okkludiert. Der Faden wurde nach 30 min wieder entfernt, um eine Reperfusion des Versorgungsgebiets der A. cerebri media und der A. choroidea anterior zu gewährleisten. Regionaler zerebraler Blutfluß wurde mittels Laser-Doppler-Flußmetrie gemessen. Dabei fiel der regionale zerebrale Blutfluß im Versorgungsgebiet der A. cerebri media auf ca. 20% des Ausgangswertes ab und erreichte den Ausgangspunkt vor Okklusion innerhalb von 5 Minuten nach dem Wiederöffnen des Gefäßes. Die Kerntemperatur der operierten Tiere wurde mittels eines Feedback-Temperatur-Reglers auf 36.5 ± 0.5 °C gehalten.

3.2.2 BrdU-Applikation

5-Bromo-2'-Deoxy-Uridin (BrdU, Sigma) wurde in 1% 1M NaOH in PBS (Konzentration 20 mg/ml) aufgelöst. Zwei Verabreichungsmethoden wurden eingesetzt: pulsatil durch tägliche intraperitoneale Injektionen (50 mg BrdU/kg Körpergewicht) und kontinuierlich durch subkutane osmotische Minipumpen (Alzet, Modell 1003D, Flußrate 1 µl/h, tägliche Gesamtdosis 24 mg/kg Körpergewicht). Die Pumpen wurden 4 Stunden vor der Implantation mit der BrdU-Lösung aufgefüllt und in einer Petrischale in der sterilen physiologischen Kochsalzlösung bei 37°C aufbewahrt. Die Pumpen wurden unmittelbar vor der vasookklusiven Operation subkutan implantiert. Alle Experimente, die *in vivo*-Applikation von BrdU beinhalteten, wurden im Laboratorium für neuronale Entwicklungsbiologie (Harvard Medical School, Boston, USA) durchgeführt.

3.2.3 Primäre neuronale Zellkultur

Alle Experimente in der Zellkultur wurden in Zusammenarbeit mit cand. med. C. F. Harms durchgeführt. Primäre kortikale neuronale Zellkulturen wurden von Wistar-Rattenembryonen (embryonaler Tag 17, E17, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin) gewonnen. Hierbei wurde zerebraler Kortex präpariert, inkubiert für 15 min in 0,05% Trypsin/ 0.02% EDTA (v/v) im PBS bei 36.5° und anschließend mit PBS gewaschen. Das Gewebe wurde dann im Dissoziationsmedium (modifiziertes Eagle-Medium mit 10% FKS, 10 mM HEPES, 44 mM Glukose, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 100 IE Insulin/l) mittels einer Pasteur-Pipette dissoziiert und bei 21°C für 2

min abzentrifugiert (Beschleunigung $210 \times g$). Die Zellen wurden dann im Starter-Medium, welches aus dem neurobasalen Medium mit B27-Zusatz, 100 U/ml Penizillin-Streptomycin, 0.5 mM L-Glutamin, 25 μ M Glutamat besteht, redissoziiert. Für pharmakologische Studien wurden die Zellen in 24-Well-Platten platziert. Für immunzytologische Färbungen wurden die Zellen auf Plastikplättchen gesät. Die Zelldichte betrug 200 000 Zellen/cm². Zur besseren Adhäsion der Zellen wurden sowohl Wells als auch Plastikplättchen mit Poly-L-Lysin und Kollagen G beschichtet. Zu diesem Zweck wurden sie zuerst mit Poly-L-Lysin (0,5 % w/v in PBS) bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit Kollagen G (0,003 % w/v im Dissoziationsmedium) für 1 Stunde bei 37°C beschichtet.

Die Zellen wurden bei 36.5°C, 95% Luft, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Das Züchtungsmedium bestand aus dem neurobasalen Medium mit B27-Zusatz, 100 U/ml Penizillin-Streptomycin und 0.5 mM L-Glutamin. Beginnend mit dem 4. Tag *in vitro*, wurde ein Mediumwechsel 2 mal pro Woche durchgeführt. Dabei wurde jeweils die Hälfte des Mediums verworfen und durch frisches ersetzt. Die kortikalen Zellen reiften 10 bis 14 Tagen *in vitro*, ehe sie für Experimente eingesetzt wurden.

3.2.4 Sauerstoff-Glukose-Entzug

Unmittelbar vor dem Experiment wurde das Züchtungsmedium entfernt; die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen. Die Kulturen wurden dann für 90 min lang in der Glukose-freien Salzlösung in die „Hypoxiekammer“ mit Sauerstoffpartialdruck $pO_2 < 2$ mmHg platziert. Nach 90 min wurde die Glukose-freie Elektrolytenlösung mit dem Züchtungsmedium wieder ausgetauscht und die normoxischen Bedingungen (95% Luft und 5 % CO₂) wiederhergestellt. Die Kontrollkulturen wurden mit der Salzlösung, die 20 mM D-GluKose enthielt, unter normoxischen Bedingungen (95% Luft und 5 % CO₂) inkubiert. Die neuronale Schädigung wurde mittels der Messung der Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) ins Medium quantifiziert (Koh und Choi, 1987). Die LDH-Menge wurde dabei mittels eines kinetischen LDH-Tests bestimmt. Die Entwicklung des zellulären Schadens wurde parallel mittels der Phasenkontrastmikroskopie evaluiert. Repräsentative Mikrophotographien wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach OGD angefertigt.

3.2.5 Vorbehandlung der Zellkultur mit Olomoucine

Der synthetische CDK-Inhibitor Olomoucine (Alexis, Grünberg) wurde in der Konzentration 50 mM im Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst. Olomoucine wurde 1 Stunde vor dem Sauerstoff-Glukose-Entzug für die gesamte Dauer des Experiments ins Medium hinzugefügt. Die Endkonzentration von Olomoucine im Medium betrug dabei 1, 10 und 100 μ M, die Endkonzentration von DMSO betrug 0.2%. Die Vehikel-behandelten Kontrollkulturen wurden lediglich DMSO in der Endkonzentration von 0.2% ausgesetzt.

3.2.6 Gewebeaufarbeitung

3.2.6.1 Transkardiale Fixation des Gewebes

Die Tiere wurden mit 10 % Chloralhydrat im PBS (6,25 ml/ kg Körpergewicht intraperitoneal) tief anästhesiert. Das vordere und mittlere Mediastinum wurde von ventral her eröffnet. Der rechte Vorhof wurde eröffnet, anschliessend der linke Ventrikel kanüliert. Die transkardiale Perfusion erfolgte mit Hilfe einer Pumpe (Flußrate 5 ml/min). Zuerst wurde mit ca. 5 ml kaltem PBS perfundiert, bis die aus Herzvorhof herausströmende Flüssigkeit weitgehend frei vom Blut wurde. Anschließend wurden ca. 50 ml 4 % PFA in PBS (pH-Wert 7.2- 7.4) transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden dann nach Aufschneiden der Kalotte und Abzug der Meningen vorsichtig entnommen und noch weitere 8 Stunden in 4 % PFA bei + 4 °C postfixiert.

3.2.6.2 Einfrieren von unfixierten Maushirnen

Die Tiere wurden mit Chloralhydrat tief anästhesiert und mit einer Schere dekapitiert. Die Hirne wurden rasch entnommen und in Methylbutan bei –40°C eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei –80°C aufbewahrt.

3.2.6.3 Schneiden und Lagerung des Gewebes

Die mit 4 % PFA transkardial fixierten Gehirne wurden am Vibratom (Technical Products, St. Louis, USA) geschnitten, wobei 40 μ m dicke koronare Schnitte angefertigt wurden. Die Schnitte wurden dann ca 24 Stunden in 30%iger Glukoselösung (in PBS) kryoprotectiert und anschließend bei – 20 °C gelagert.

Die unfixiert eingefrorenen Gehirne („fresh frozen“) wurden am Kryostat (Microm, Heidelberg) geschnitten. 10 µm dicke koronare Sektionen wurden auf kurz vorgewärmte Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgenommen.

3.2.7 In Situ-Markierung der nukleären DNA-Fragmentation

Zur *In Situ*-Markierung der nukleären DNA-Brüche wurde die Methode der spezifischen Bindung der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) an die 3'-OH-Bruchstellen der DNA (=„nick end“) verwendet (Gavrieli et al., 1992). TdT erkennt die 3'-OH-Enden und katalysiert eine Schablone-unabhängige Addition von Nukleotid-Triphosphaten. Als Substrat diente das Digoxigenin-konjugierte Desoxyuridin (dUTP). Die inkorporierten dUTP-Digoxenin-Komplexe wurden dann mittels eines mit einem anti-Digoxenin-Antikörper (Peroxidase- oder Fluorescein-konjugiert) nachgewiesen (s. Abb. 5).

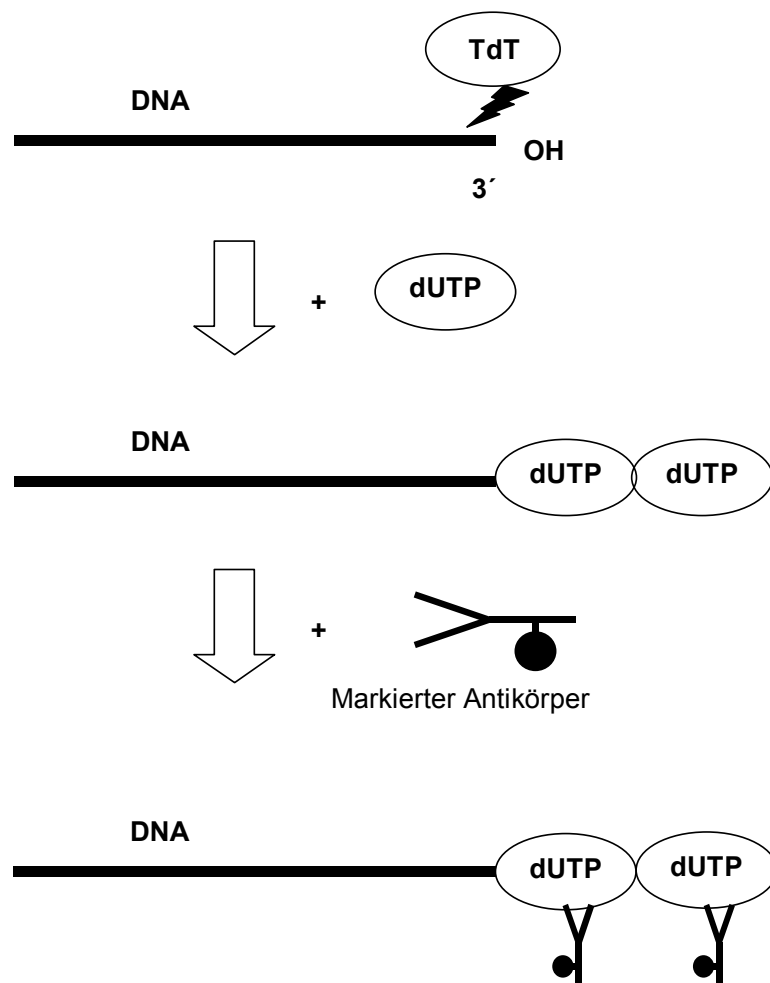


Abb. 5:

Das kommerziell erhältliche Kit ApopTag (S 7100 und S 7110) für TdT-vermittelte dUTP-Biotin- „nick end labeling“ (TUNEL) von der Fa. Intergen (Heidelberg) wurde verwendet. Hierauf beziehen sich die Begriffe „Working solution“, „Equilibration buffer“, „Reaction buffer“ und „Stop solution“.

3.2.7.1 TUNEL mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromagen

Gefrierschnitte wurden aus dem Gefrierfach entnommen und für 2 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Das folgende Protokoll wurde dann verwendet:

- 1) Fixation in 1% PFA für 10 min bei Raumtemperatur
- 2) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 3) Dehydratation der Schnitte in der aufsteigenden Ethanolreihe
- 4) Entfettung in Chlorophorm für 30 min bei Raumtemperatur
- 5) Rehydratation der Schnitte in der aufsteigenden Ethanolreihe
- 6) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 7) Inkubation im „Equilibration buffer“ für 1 min bei Raumtemperatur (ca. 20 µl pro Schnitt)
- 8) Inkubation mit 15 µl „Working solution“ (4,5 µl TdT und 10,5 µl „Reaction buffer“) in einer Feuchtkammer bei 37°C für 60 min
- 9) Waschen in der „Stop solution“ für 10 min
- 10) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 11) Inkubation mit HRP-konjugiertem Antikörper (12 µl pro Schnitt) in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 30 min
- 12) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 13) Inkubation mit 0.05% DAB/ 0.01% H₂O₂ in PBS für 3 min
- 14) Waschen in destilliertem H₂O für 5 min
- 15) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS

3.2.7.2 TUNEL mit Fluorescein als Chromogen

- 1)-10) wie 3. 2. 7.1
- 11) Inkubation mit FITC-konjugiertem Antikörper (12 µl pro Schnitt, Intergen) in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 30 min
- 12) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS

3.2.8 Immunhistochemie

3.2.8.1 Doppelfärbungen gegen TUNEL und Zellmarker

Es wurden Kryostatschnitte gefärbt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur 10 min lang mit 4% PFA fixiert und anschliessend in PBS gewaschen. Das Protokoll der Färbung:

- 1) Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C :

<i>primärer Antikörper</i>	<i>Typ</i>	<i>Spezies</i>	<i>Titer</i>	<i>sekundärer Antikörper</i>
anti-NeuN	monoklonal	Maus	1:100	biotinylierter anti-Maus-IgG (hergestellt im Pferd)
anti-MAP2	monoklonal	Maus	1:1000	
anti-GFAP	polyklonal	Kanninchen	1:500	biotinylierter anti-Kanninchen-IgG (hergestellt in der Ziege)
anti-MAC-1	monoklonal	Ratte	1:1000	biotinylierter anti-Ratte-IgG (hergestellt im Kanninchen)

- 2) dreimaliges Waschen in PBS jeweils 5 min
- 3) Inkubation mit dem zugehörigen sekundären Antikörper in 3%igem Serum für 1 h bei Raumtemperatur
- 4) dreimaliges Waschen in PBS jeweils 5 min
- 5) Inkubation mit dem an Texas-Red-gekoppelten Streptavidin (1:200) für 1 h bei Raumtemperatur
- 6) dreimaliges Waschen in PBS jeweils 5 min
- 7) TUNEL-Färbung mit Fluorescein als Chromogen nach dem Protokoll 3. 2. 7. 2
- 8) dreimaliges Waschen in PBS jeweils 5 min
- 9) Eindeckeln der Schnitte mit dem Einschlußmittel ImmunoFluor (ICN, Eschwege)

3.2.8.2 Immunhistochemie gegen verschiedene striatale Neurone

Immunhistochemische Färbungen gegen striatale Marker wurden an Vibratomschnitten der mit PFA transkardial fixierten Maushirne frei-flottierend („free-floating technique“) in 24-well-Platten durchgeführt.

Das Protokoll der Färbung:

- 1) Blockierung der endogenen Peroxidase durch 15minütige Inkubation der Schnitte in 3 % H_2O_2 in dH_2O bei Raumtemperatur
- 2) 2maliges Waschen im PBS für 5 min bei Raumtemperatur
- 3) Permeabilisieren des fixierten Gewebes und Blockieren der unspezifischen Bindungen mit 5 %igem Ziegenserum/ 0.3% Triton X-100 in PBS für 30 min bei Raumtemperatur
- 4) Inkubation der Schnitte mit folgenden primären Antikörpern für 24 h bei Raumtemperatur:

<i>primärer Antikörper</i>	<i>Titer</i>	<i>Typ/ Hergestellt in</i>	<i>zugehöriger sekundärer Antikörper</i>
anti- Cholin-Azetyl- Transferase	1:1000	polyklonal/ Kaninchen	biotinylierter anti- Kaninchen IgG (hergestellt in der Ziege)
anti- Somatostatin	1:5000		
anti- Calretinin	1:1000		
anti-Enkephalin	1:1000		
anti- μ -Opioid-Rezeptor	1:1000		
anti- Substanz P	1:200	monokonal/ Maus	biotinylierter anti- Maus IgG (hergestellt im Pferd)
anti- Parvalbumin	1:10000		

- 5) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 6) Inkubation im zugehörigen sekundären Antikörper (Titer 1: 500 für biotinylierten anti-Maus-IgG-Antikörper und 1: 250 für biotinylierten anti-Ziege-IgG-Antikörper) für 90 min bei Raumtemperatur
- 7) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 8) Inkubation im Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Peroxidase-EliteKit) für 1 h bei Raumtemperatur
- 9) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 10) Entwicklung der Färbung in 0.05% 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)/ 0.3% Ammoniumnickelsulfat/ 0.003% H_2O_2 (alles Sigma) für 3 min
- 11) Stoppen der DAB-Reaktion mit ddH_2O
- 12) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS

Die frei-flottierend gefärbten Schnitte wurden dann mit Hilfe eines Pinsels auf die geladenen Glasobjektträger aufgetragen, für 30 min luftgetrocknet, in der aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol- 80% Ethanol- 96% Ethanol- 100% Ethanol-100% Ethanol) dehydriert und anschließend für 10 min in Rotihistol (Roth, Karlsruhe) fixiert. Die Präparate wurden dann mit dem Einschlußmittel Vitro-Clud (R.Langenbrick GmbH, Emmendingen) eingedeckelt.

3.2.8.3 Immunhistochemie gegen Zellzyklusmarker

Die am Vibratom angefertigten koronaren Schnitte wurden frei-flottierend in 24-Well-Platten gefärbt. Das Protokoll der Färbung:

- 1) Blockierung der endogenen Peroxidase durch 15minütige Inkubation der Schnitte in 3 % H_2O_2 in ddH₂O bei Raumtemperatur
- 2) 2maliges Waschen im PBS für 5 min bei Raumtemperatur
- 3) Permeabilisieren des fixierten Gewebes und Blockieren der unspezifischen Bindungen mit 5 %igem Ziegen Serum/ 0.3% Triton X-100 in PBS für 30 min bei Raumtemperatur
- 4) Inkubation der Schnitte mit folgenden primären Antikörpern für 18 h bei + 4 °C:

<i>primärer Antikörper</i>	<i>Klonalität</i>	<i>Hergestellt in</i>	<i>Titer</i>	<i>sekundärer Antikörper</i>
anti-p16	polyklonal	Kaninchen	1: 250	biotinylierter anti-Kaninchen-IgG (hergestellt in der Ziege)
anti-p27	polyklonal	Kaninchen	1: 250	
anti-Cyclin D1	polyklonal	Kaninchen	1: 500	
anti-Cyclin E	polyklonal	Kaninchen	1: 250	
anti-Cyclin A	polyklonal	Kaninchen	1: 250	
anti-Cyclin B	polyklonal	Kaninchen	1: 250	
anti-CDK4	polyklonal	Kaninchen	1: 500	
anti-CDK2	polyklonal	Kaninchen	1: 250	

- 5) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 6) Inkubation mit biotinyliertem anti-Kaninchen-IgG (1:250) für 90 min bei Raumtemperatur
- 7) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 8) Inkubation im Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Peroxidase-EliteKit) für 1 h bei Raumtemperatur
- 9) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS

- 10) Entwicklung der Färbung in 0.05% DAB-Lösung in 0.003% H₂O₂ (in PBS)
- 11) Stoppen der DAB-Reaktion mit ddH₂O
- 12) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS

3.2.8.4 Doppelfärbungen gegen Zellzyklusmarker und neuronale Marker

Das Protokoll der Färbung:

- 1) bis 7) Siehe das Protokoll in 3. 2. 8. 3
- 8) Inkubation mit TexasRed-gekoppeltem Streptavidin (1:200) für 1 h bei Raumtemperatur
- 9) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 10) Inkubation mit anti-NeuN (1:100) oder anti-MAP2 (1:1000) für 18 h bei + 4°C
- 11) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 12) Inkubation mit Alexa488-gekoppeltem anti-Maus-IgG (1: 500) für 90 min bei Raumtemperatur
- 13) dreimaliges Waschen der Schnitte für 5 min im PBS
- 14) Eindeckeln mit dem ImmunoFluor-Einschlußmittel

3.2.8.5 Immunhistochemie gegen BrdU

Das Protokoll der Färbung:

- 1) Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation der Schnitte in 3 % H₂O₂ in ddH₂O für 15 min bei Raumtemperatur
- 2) 2maliges Waschen in PBS für 5 min bei Raumtemperatur
- 3) Denaturieren der DNA durch Inkubation in 2 M HCl für 60 min bei + 37°C
- 4) 2maliges Waschen im PBS für 5 min bei Raumtemperatur
- 5) Inkubation mit 5 %igem Kaninchenserum/ 0.3% Triton X-100 in PBS für 30 min bei Raumtemperatur
- 6) Inkubation der Schnitte mit anti-BrdU (monoklonal, hergestellt in Ratte; Titer 1:200 in 5% Kaninchenserum in PBS) für 18 h bei + 4 ° C
- 7) dreimaliges Waschen in PBS
- 8) Inkubation mit biotinyliertem anti-Ratte-IgG (1:250) für 60 min bei Raumtemperatur
- 9) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS

- 10) Inkubation im Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Peroxidase-EliteKit) für 1 h bei Raumtemperatur
- 11) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS
- 12) Reaktion mit 0.05% DAB-Lösung in 0.003% H₂O₂ (in PBS)
- 13) Stoppen der DAB-Reaktion mit ddH₂O
- 14) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min im PBS

3.2.8.6 Doppelfärbungen gegen TUNEL und BrdU

Die Gefrierschnitte wurden zuerst nach dem Protokoll 3. 2. 7. 2 gefärbt. Anschließend erfolgte die Färbung gegen BrdU nach dem Protokoll 3. 2.. 8. 5 mit TexasRed als Chromogen. Im Schritt 10) wurde anstelle mit Avidin-Biotin-Komplex mit TexasRed-Streptavidin (1:500 in PBS) inkubiert.

3.2.8.7 Immunzytochemie in Zellkultur

Die Färbung der primären neuronalen Kulturen erfolgte auf den mit poly-Lysin beschichteten Plättchen, welche in 24-well-Platten (je 1 Plättchen pro well) platziert wurden. Die Kulturen wurde sehr kurz mit PBS gewaschen und sofort mit 4% PFA für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde nach folgendem Protokoll gefärbt:

- 1) Permeabilisieren und Blockieren der unspezifischen Bindungen mit 5 %igem Ziegsenrum/ 0.3% Triton X-100 in PBS für 30 min bei Raumtemperatur
- 4) Inkubation der Plättchen mit folgenden primären Antikörpern für 1 h bei Raumtemperatur:

<i>primärer Antikörper</i>	<i>Klonalität</i>	<i>Hergestellt in</i>	<i>Titer</i>	<i>sekundärer Antikörper</i>
anti-p16	polyklonal	Kaninchen	1: 100	Texas-Red gekoppeltes anti-Kaninchen-IgG (hergestellt in der Ziege)
anti-p27	polyklonal	Kaninchen	1: 100	
anti-Cyclin D1	polyklonal	Kaninchen	1: 100	

- 5) dreimaliges Waschen je 5 min in PBS
- 6) Inkubation mit Texas-Red gekoppeltem anti-Kaninchen-IgG (1:500) für 30 min bei Raumtemperatur
- 7) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min in PBS

- 8) Inkubation mit anti-NeuN (1:100) oder anti-MAP2 (1:1000) für 1 h bei Raumtemperatur
- 9) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min in PBS
- 10) Inkubation mit Alexa488-gekoppeltem anti-Maus-IgG (1: 500) für 30 min bei Raumtemperatur
- 11) dreimaliges Waschen der Schnitte je 5 min in PBS
- 12) Eindeckeln mit dem Einschlußmittel Vitro-Clud

3.2.9 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Konventionelle Licht- und Fluoreszenzmikroskopie der Gehirnschnitte wurde am Mikroskop Leica DMRA (Leica Microsystems, Heidelberg) durchgeführt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe der Leistung 100 Watt (Osram GmbH, München) eingesetzt. Folgende Filter wurden benützt:

<i>Filterbezeichnung</i>	<i>Wellenlänge des Anregungsfilters, in nm</i>	<i>Wellenlänge des Sperrfilters, in nm</i>	<i>verwendete Chromogenen</i>
MS2	470	522	Fluorescein (=FITC), Alexa488
MS3	546	567	TexasRed

Mikroskopie der primären neuronalen Zellkultur erfolgte am inversen Mikroskop Leica DMIL (Leica Microsystems). Alle Aufnahmen erfolgten mit der digitalen Kamera DC200 (Leica Microsystems).

3.2.10 Konfokale Mikroskopie

Das Bio-Rad MRC 600 konfokale Laserscan-System (Bio-Rad, Hempstead, UK) –ausgerüstet mit einem Nikon Optiphot-Mikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf)– wurde verwendet. Ein Argon/Krypton-Laser wurde benutzt, um die Farbstoffe Alexa-488 bzw. FITC mit einer Linie der Wellenlänge 488 nm anzuregen. Das Fluorochromogen TexasRed wurde bei der Wellenlänge 568 nm angeregt. Folgende Objektive wurden eingesetzt: Nikon 40/1.30 Ölimmersion und Leitz 63/1.30 Ölimmersion. Jedes digitalisierte Bild beinhaltete 768 x 512 Pixel. Die Bilder wurden mittels des Programms CoMOS Version 7a (Bio-Rad) aufgenommen und

anschließend mit Hilfe des Software-Programms Adobe Photoshop (Version 5.0, Adobe Systems, Mountain View, CA) weiter bearbeitet.

3.2.11 Western Blotting

Die Zellen wurden für die Western-Blot- Untersuchungen bei 4 °C 30 min lang in 130 µl RIPA Puffer lysiert (10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0, 300 mM NaCl, 0.1% w/v SDS, 1% v/ v NP40, 1% w/v Na-deoxycholate, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, und Protease/Phosphatase Inhibitoren, Boehringer Mannheim, Mannheim). Die Proteine wurden dann durch Aufkochen in Probenpuffer denaturiert (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% w/ v DTT, 2% w/v SDS, and 0.01% w/v Bromphenolblau) für 3 min. Proteinkonzentration der Proben wurde mit dem BCA-Assay Kit von Pierce (Rockford, IL, USA) und Kälberserum-Albumin photometrisch bestimmt. Weitere Schritte:

- 1) Die Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt
- 2) Die aufgetrennten Proteine im Gel wurden anschliessend auf eine Poly-Vinylidendifluorid-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte bei 0.8 mA/cm² Stromstärke 2 Stunden lang in einem Transferpuffer
- 3) Blockierung der Membranen mit 5 % Milch für 1 Stunde bei Raumtemperatur in TBST
- 4) Inkubation mit den primären Antikörpern übernacht bei 4 °C
Die folgenden primären Antikörper wurden verwendet: anti-p16^{INK4a}, anti-p27^{Kip1}, anti-CyclinD1 (alle 0.2 mg/ml). Die gleichmässige Ladung der SDS-PAGE-Gele wurde mit anti-Aktin-Antikörper (1:2000) kontrolliert
- 5) 4-maliges Waschen für 10 min. in TBST
- 6) Inkubation mit HRP-konjugierten anti-Kaninchen.IgG-Antikörper (1:5000 in 1% Milch in TBST) für 1 Stunde bei Raumtemperatur
- 7) 4-maliges Waschen für 10 min. in TBST
- 8) Die spezifischen Signale wurden dann mit einem Enhanced Chemiluminescence Assay (ECL, Amersham) visualisiert und auf Röntgen-Film belichtet.
- 9) Die semiquantitative Untersuchung der spezifischen Signale auf den Röntgen-Filmen erfolgte mit der Software Scion Image, Version Beta 4.0.2 (Scion

Corporation, Frederick, MD). Die Gesamtintensität der spezifischen Signalen in einem Blot wurde als 100 % gesetzt und die einzelnen Banden im Verhältnis dazu gewertet. Die Ergebnisse von mindestens 3 Experimenten wurden statistisch ausgewertet.

3.2.12 Histon-Kinase-Assay

Der Histon-Kinase-Assay wurden in Zusammenarbeit mit Dr. L. Hauck (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) durchgeführt. Anti-CDK2-Immunkomplexe wurden 2 mal im Lyse-Puffer und anschliessend im eiskalten Kinasepufer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1.0 DTT) gewaschen. Die Immunkomplexe wurden dann in 50 µl Kinase-Puffer mit 10 µg Lysin-reiches Histon HIIIS (Sigma) sowie 10 µCi [γ -³²P]ATP (111 MBq/mmol; NEN, Boston, USA) resuspendiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl SDS-Puffer gestoppt. 30 µl von jeder Probe wurden durch die SDS-PAGE aufgetrennt. Die Radioaktivität wurde dann mittels Phosphoimager und TINA software quantifiziert.

3.2.13 Elektronenmikroskopie

Die Tiere wurden transkardial mit 0.1% Glutaraldehyd/ 2 % Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Nach einer 8-stündigen Postfixation im gleichen Fixativ bei 4°C wurden am Vibratom 60 µm dicke Schnitte angefertigt. In frei-flottierender Technik wurden dann die Schnitte gegen BrdU mit DAB als Chromogen nach dem Protokoll 3. 2. 8. 5 gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend in 2.5% Glutaraldehyd für 30 min postfixiert und nach dem folgenden Protokoll in Resin eingebettet:

- 1) Waschen in PBS für 1 h bei Raumtemperatur
- 2) Inkubation in 1 % OsO₄ (in ddH₂O) für 45 min bei Raumtemperatur
- 3) dreimaliges Waschen in PBS für 2 min
- 4) Inkubation in 2 % Uranylazetat (in PBS) für 1 h bei -4°C
- 5) Dehydratation der Schnitte in der aufsteigenden Ethanolreihe:
 - 70 % Ethanol für 2 min
 - 80 % Ethanol für 2 min
 - 96 % Ethanol für 2 min
 - 2 x 100 % Ethanol für 5 min

- 6) Inkubation im Resin-Ethanol-Gemisch (1/3 Resin und 2/3 100% Ethanol) für 10 min bei Raumtemperatur
- 7) Inkubation im Resin-Ethanol-Gemisch (1/2 Resin und 1/2 100% Ethanol) für 30 min bei Raumtemperatur
- 8) Inkubation in Resin über Nacht bei Raumtemperatur
- 9) Inkubation in frischem Resin über Nacht bei Raumtemperatur

Die Schnitte wurden dann zwischen zwei Plastikdeckeln in einem Ofen bei +60°C für 48 Stunden aufbewahrt.

Die Semindünnschnitte sowie die entsprechenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise im neuropathologischen Laboratorium (Professor Dr. med. Brück, Institut für Neuropathologie, Charité) angefertigt (Elektronenmikroskop: Zeiss EM10).

3.2.14 Zellzählprotokolle

Um die Anzahl der p16^{INK4a}-negativen MAP2-positiven Zellen im geschädigten Areal zu quantifizieren, wurden 4 Schnitte im Bereich der vorderen Kommissur (jeweils 80 µm entfernt) pro Tier ausgezählt. Sieben zufällig ausgewählte nicht-überlappende „High-Power“-Felder (Vergrößerung x 400) aus dem Striatum wurden pro Schnitt untersucht (n=3 für jeden Reperusionszeitpunkt sowie für Sham-operierte Kontrolle). Alle MAP2-positiven Neurone wurden dabei ausgezählt und dann die Anzahl der p16^{INK4a}-negativen Zellen dieser Zellpopulation bestimmt.

Striatale TUNEL-positive Zellen wurden ebenfalls im Bereich der vorderen Kommissur in sieben zufällig ausgewählten nicht-überlappenden High-Power-Feldern bestimmt (n=3 für jeden Reperusionszeitpunkt sowie für Sham-operierte Kontrolle). Die Zellen wurden als TUNEL-positiv klassifiziert, wenn sie ein deutliches nukleäres Signal mit kondensierten Nuklei ohne zytoplasmatische Anfärbung aufwiesen.

Die TUNEL- und BrdU-doppeltgefärbten Zellen wurden zum Reperusionszeitpunkt 72 h nach der MCA-Okklusion (n=4) in 3 zufällig ausgewählten Hirnschnitten im Bereich der vorderen Kommissur ausgezählt, wobei 12 „High-Power“-Felder (HPF) untersucht wurden. In jedem HPF wurden alle TUNEL-positiven sowie TUNEL- und BrdU-positive Zellen ausgezählt und der prozentuelle Anteil der BrdU-positiven Zellen ermittelt.

BrdU-positive Zellen wurden in 8 Tieren (4 Tiere mit täglichen BrdU-Injektionen und 4 Tiere mit kontinuierlicher BrdU-Applikation via Mini-Pumpe) in 3 zufällig ausgewählten 800 µm x 800 µm-Feldern innerhalb des Striatums im Bereich der vorderen Kommissur bestimmt.

3.2.15 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Alle *in vivo*-Experimente wurden an 3 bis 7 Tieren durchgeführt. Die Anzahl der Interneurone im ischämischen und intakten kontralateralen Striatum (s. Ergebnisse 4.1) sowie die Anzahl der BrdU-positiven Zellen im ischämischen Striatum bei kontinuierlicher und pulsatiler BrdU-Applikation (s. Ergebnisse 4.3.3) wurden mit Student-*t*-Test miteinander verglichen. Die Anzahl der p16-negativen Neurone nach 9 h, 18 h, 48 h und 72 h nach MCAo versus Sham-operierten Tieren (s. Ergebnisse 4.3.1) wurden mittels ANOVA-Test und Tukey post hoc Test verglichen. Alle *in vitro*-Daten wurden aus mindestens 3 unabhängigen Zellkulturexperimenten zusammengefaßt (s. Ergebnisse 4.4). Die Gruppen wurden one-way ANOVA-Test verglichen. Anschließend wurde der Tukey post hoc Test angewandt. $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Modells der milden fokalen zerebralen Ischämie

Zunächst wurde die zelluläre Schädigung nach einer 30- minutigen Okklusion der A. cerebri media (sogenannte milde Ischämie) näher charakterisiert. Es wurden das zeitliche, das topisch-anatomische sowie das zytologische Profil des Zellunterganges untersucht.

Aus den Vorarbeiten (Endres et al., 1998) war bekannt, daß in diesem Schlaganfallmodell der maximale Zelluntergang 72 Stunden nach dem Beginn der Reperfusion stattfindet. Zu späteren Zeitpunkten stellt man nämlich keine weitere Reduktion der Zahl der intakten Zellen im Ischämiebereich mehr fest (Endres et al., 1998, 2000). Davon ausgehend wurden folgende Reperusionszeiten für weitere Experimente festgelegt: 4 ½, 9, 18, 27, 36, 48 und 72 Stunden nach dem Beginn der Reperfusion. Für jeden Zeitpunkt wurden mindestens 4 Tiere histologisch und histochemisch aufgearbeitet. Als Marker der ischämischen Schädigung wurde die *In Situ*-Markierung der nukleären DNA-Fragmentation mit TUNEL-Färbung (TdT-vermittelte dUTP-Biotin- „nick end labeling“, s. Methodik 3. 2. 7) gewählt, die Doppelstrangbrüche in der DNA detektiert (Gavrieli et al., 1992). Besonders bei der Detektion des verzögerten ischämischen Zellschadens findet TUNEL-Färbung eine breite Anwendung (Li et al., 1995; Du et al., 1996; Endres et al., 1998) und wurde in vielen unabhängigen Studien kritisch evaluiert (Charriaut-Marlangue und Ben-Ari, 1995; Cervos-Navarro und Schubert, 1996; Labat-Moleur et al., 1998). Nur Zellen mit einem starken nukleären TUNEL-Signal sowie kondensiertem Chromatin wurden als TUNEL-positiv gewertet (Farbabb 1C, Insert, s. Seite 79), wohingegen Zellen mit einem schwachen zytoplasmatischen oder nukleären Signal als TUNEL-negativ interpretiert wurden. Zum Zeitpunkt von 9 Stunden ließen sich nur in wenigen Schnitten einzelne TUNEL-positive Zellen im ischämischen Striatum nachweisen (Farbabb. 1 A, s. Seite 79). Eine deutliche TUNEL-Positivität wurde zum Zeitpunkt 36 Stunden nach MCAo detektiert (Farbabb. 1 B, s. Seite 79), während die maximale Anzahl der TUNEL-positiven Zellen zum Zeitpunkt von 72 Stunden festgestellt wurde (Farbabb. 1 C, s. Seite 79). Somit handelt es sich in diesem Modell um einen verzögert ablaufenden Zelltod.

Das topisch-anatomische Ausmaß der Schädigung wurde histologisch und immunhistochemisch evaluiert. Zu diesem Zwecke wurde die immunhistochemische Färbung gegen den neuronalen Marker „microtubule-associated protein“ 2 (MAP2) zum Zeitpunkt des maximalen Zellschadens nach 72 Stunden durchgeführt. MAP2 ist ein hochmolekulares Protein, welches als Bestandteil des Cytoskeletons in Perikarya und Dendriten intakter Neurone exprimiert wird (Bernhardt und Matus, 1984; Caceres et al, 1984). Der Verlust der Immunreaktivität gegen MAP2 blieb auf das Striatum beschränkt, während im ipsilateralen Kortex keine Reduktion des Signals zu verzeichnen war (Farbabb. 1 D, s. Seite 79). Das TUNEL-Signal wurde ebenfalls nur im Striatumdetektiert, während TUNEL-positive Zellen im Kortex nicht festgestellt werden konnten (Farbabb. 1 E, s. Seite 79). Somit liegt in diesem Modell eine selektive Schädigung des Striatums vor.

Um den Zelltyp der zugrundegehenden Zellen näher zu charakterisieren, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen von TUNEL mit zellspezifischen Markern durchgeführt. Als neuronaler Marker wurde „neuron-specific nuclear protein“ (NeuN) benutzt, welches in allen adulten Neuronen nukleär exprimiert wird (Mullen et al., 1992). Als gliale Marker wurden „glial fibrillary acid protein“ (GFAP) für Astrozyten (Bignami und Dahl, 1977) und Typ III-Complement-Rezeptor MAC-1 für Mikroglia/Makrophagen (Ho und Springer, 1982; Perry et al., 1985) verwendet. Folgende Zeitpunkte wurden untersucht: 4 ½ h, 9 h, 18 h, 36 h und 72 h nach MCAo. Während TUNEL-positive Zellen die NeuN-Immunreaktivität aufwiesen (Farbabb 2 A-C, s. Seite 79), konnten wir bis zum Zeitpunkt von 72 Stunden keine Doppelfärbung mit GFAP (Farbabb. 2 D-F, s. Seite 79) und MAC-1 (Farbabb. 2 G-I, s. Seite 79) feststellen. Somit handelt es sich in diesem Modell um einen selektiven Untergang von Neuronen, während Gliazellen den Insult weitgehend überleben.

Zwei Hauptgruppen von Neuronen können im Striatum unterschieden werden: Projektionsneurone und Interneurone. Projektionsneurone, die wegen ihres typischen morphologischen Aussehens als „medium-spiny neurons“ bezeichnet werden, bilden über 90 Prozent der neuronalen Zellpopulation aus, während Interneurone die restlichen 10 Prozent ausmachen. Striatale Interneurone werden weiterhin nach ihren Transmittern in cholinerg, somatostatinerg und GABAerg eingeteilt. Die GABAergen Interneurone werden noch weiter in Parvalbumin- und Calretinin-haltig differenziert. Um der Frage nachzugehen, welche dieser Neuronenpopulationen in unserem

Modell untergehen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen Marker der Projektionsneurone L-Enkephalin und Neurokinin B sowie gegen Marker der Interneurone Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT), Somatostatin, Parvalbumin und Calretinin angefertigt. Es wurde eine deutliche Reduktion der Immunreaktivität gegen L-Enkephalin (Farbabb. 3 A, s. Seite 81) und Neurokinin B (Farbabb. 3 B, s. Seite 81) nachgewiesen. Die Immunreaktivität gegen Cholin-Acetyl-Transferase (Farbabb. 4 A-B, s. Seite 83), gegen Somatostatin (Farbabb. 4 C-D, s. Seite 83), gegen Parvalbumin (Farbabb. 5 A-B, s. Seite 85) sowie gegen Calretinin (Farbabb. 5 C-D, s. Seite 85) blieb zum Zeitpunkt 72 h nach der MCA-Okklusion erhalten. An benachbarten Schnitten wurden Nissl- und TUNEL-Färbungen durchgeführt, wobei ein Zelluntergang detektiert wurde. In der Nissl-Färbung wurden pyknotische Neurone (Farabb. 4 E-F, s. Seite 83), in der TUNEL-Färbung TUNEL-positive Zellen (Farbabb. 5 E-F, s. Seite 85) nachgewiesen. Auszählung der Interneurone zum Zeitpunkt 72 h nach Ischämie ergab keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Interneurone auf der ischämischen vs. kontralateralen Seite (Tabelle 2, Abb. 6). Calretinin-haltige GABAerge Neurone wurden –wegen der zu geringen Zellzahlen (im Durchschnitt weniger als 1 Zelle pro High-Power-Field [HPF]) – nicht angegeben.

Tabelle 2:

<i>Neuronaler Typ</i>	<i>Ischämisches Striatum, Zellen/HPF \pm SEM</i>	<i>Kontralaterales Striatum, Zellen/HPF \pm SEM</i>	<i>Signifikanz</i>
Cholinerg	44 \pm 2	40 \pm 7	p> 0.05 (n=3)
Somatostatinerg	41 \pm 3	41 \pm 1	p> 0.05 (n=3)
Parvalbumin-haltig	31 \pm 5	38 \pm 6	p> 0.05 (n=3)

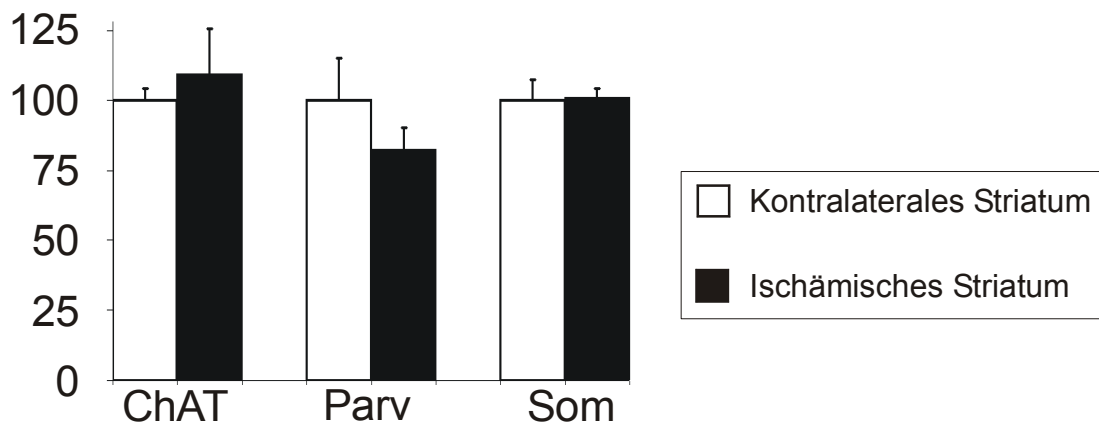


Abb. 6: Auszählung der Interneurone im ischämischen (weisse Balken) und kontralateralen (schwarze Balken) Striatum 72 h nach MCAo. Die Zahl der Interneurone auf der nicht-betroffenen (kontralateralen) Seite wurde gleich 100% gesetzt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt ($p > 0.05$, $n=3$).

Somit handelt es sich in unserem Modell um einen selektiven Untergang der Projektionsneurone.

Aufgrund unterschiedlicher kortikaler, thalamischer sowie nigraler Afferenzen und Efferenzen können Projektionsneurone weiterhin in 2 Systeme eingeteilt werden: Matrix (85% des Gesamtvolumens des Striatums) und Striosomen („patch“, 15% des Gesamtvolumens). Striosomen können aufgrund ihres hohen Gehalts am μ -Opioid-Rezeptor immunhistochemisch dargestellt werden. Um zu prüfen, ob Projektionsneurone in Striosomen bzw. Matrix unterschiedliche Vulnerabilität gegenüber milder Ischämie aufweisen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen μ -Opioid-Rezeptor zum Reperfusionszeitpunkt 72 h durchgeführt. Es wurde ein deutlicher Verlust der Immunreaktivität auf der ischämischen Seite detektiert (Farbabb. 3 C, Seite 81). Somit besteht kein Unterschied in der Vulnerabilität striosomaler und nicht-striosomaler Projektionsneurone.

Zusammenfassend liegt in unserem Modell ein verzögerter selektiver Zelluntergang der Projektionsneurone in der Matrix und Striosomen vor.

4.2 Expression von Zellzyklus-relevanten Proteinen im intakten adulten Maushirn

Zunächst wurde die Expression von zellzyklusaktivierenden sowie zellzyklusinhibierenden Proteinen im adulten murinen Striatum analysiert. Es wurden die Cyclin-abhängige Kinasen CDK4, CDK2, die Cycline Cyclin D1, Cyclin E, Cyclin A, Cyclin B1 sowie CDK-Inhibitoren $p16^{\text{INK4a}}$ und $p27^{\text{Kip1}}$ in Hirnschnitten immunhistochemisch untersucht. Während im intakten Striatum keine Immunreaktivität für Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen sowie $p27^{\text{Kip1}}$ festgestellt wurde, fand sich eine starke nukleäre Expression von $p16^{\text{INK4a}}$ im Striatum (Farbabb. 6 A, s. Seite 87). Doppelmarkierungen mit dem neuronalen Marker NeuN, der in allen adulten Neuronen im Nukleus gefunden wird (Mullen et al, 1992), zeigten, daß alle striatalen Neurone im intakten Zustand $p16^{\text{INK4a}}$ exprimieren (Farbabb. 6 A-C, s. Seite 87).

4.3 Untersuchung von Zellzyklusproteinen nach milder Ischämie

4.3.1 Expression des CDK-Inhibitors $p16^{\text{INK4a}}$ in Neuronen im ischämischen Striatum

Weiterhin wurden Veränderungen der Expression der zellzyklusrelevanten Proteine nach milder Ischämie untersucht. Die immunhistochemischen Doppelfärbungen gegen $p16^{\text{INK4a}}$ und den neuronalen Marker NeuN offenbarten eine deutliche Herunterregulierung von $p16^{\text{INK4a}}$ in den Neuronen im ischämischen Striatum bereits zum Zeitpunkt 9 h nach der MCA Okklusion/ Perfusion (Farbabb. 6 D-F, s. Seite 87). Allerdings könnte der Verlust der $p16^{\text{INK4a}}$ -Immunreaktivität im geschädigten Striatum lediglich ein unspezifischer Ausdruck des allgemeinen Proteinverlustes im Rahmen des neuronalen Zelltodes darstellen. Um zu prüfen, ob $p16^{\text{INK4a}}$ spezifisch herunterreguliert wird, wurden Doppelfärbungen von $p16^{\text{INK4a}}$ mit „microtubule-associated protein“ 2 (MAP2) unternommen. MAP2 wird beim ischämischen Tod frühzeitig degradiert und gilt als ein besonders sensibler Marker für den ischämischen zellulären Schaden (Kitagawa et al., 1989; Matesic und Lin, 1994). Tatsächlich fand der Verlust des immunhistochemischen $p16^{\text{INK4a}}$ - Signals in noch MAP2-positiven Neuronen statt (Farbabb. 7 A-F, s. Seite 87), was eindeutig

gegen einen unspezifischen Verlust von p16^{INK4a} im Rahmen einer allgemeinen Proteindegradierung spricht.

Die Beziehung des p16^{INK4a}- Verlustes zum verzögerten neuronalen Zelltod nach milder Ischämie wurde näher charakterisiert: Hierzu wurde die p16^{INK4a}-Herunterregulierung und TUNEL-Positivität im ischämischen Striatum zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Der Prozentsatz der MAP2-positiven Neuronen, bei denen p16^{INK4a} herunterreguliert war, wurde zu den Reperusionszeitpunkten 9 h, 18 h, 48 h, 72 h sowie in sham-operierten Kontrolltieren ausgezählt. In Kontrolltieren waren alle Neurone p16^{INK4a}-positiv. Zum Zeitpunkt 9 h nach MCAo waren $48,0 \pm 8,3$ % aller MAP2-positiven Zellen p16^{INK4a}-negativ. Die Anzahl der MAP2-positiven p16^{INK4a}-negativen Neurone nahm dann zu späteren Reperusionszeitpunkten stetig ab: $23,3 \pm 1,8$ % nach 18 h, $16,7 \pm 8,3$ % nach 48 h. Zum Zeitpunkt 72 h wurden keine MAP2-positiven p16^{INK4a}-negativen Neurone festgestellt (Abb. 7 A, s. Seite 42). Zu denselben Reperusionszeiten, zu denen die p16^{INK4a}-Immunreaktivität quantifiziert wurde (9 h, 18 h, 48 h und 72 h, jeweils n=3), erfolgte die Bestimmung der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen pro mm². Die ersten sicher nachweisbaren TUNEL-positiven Zellen erschienen zum Zeitpunkt 18 h ($400 \text{ Zellen/mm}^2 \pm 48$), nahmen dann zum Zeitpunkt 48 h zu ($3888 \text{ Zellen/mm}^2 \pm 381$) und erreichten ihr Maximum bei 72 h ($5488 \text{ Zellen/mm}^2 \pm 1041$) (Abb. 7 B). Zusammenfassend ging also der Verlust der p16^{INK4a}-Immunreaktivität der TUNEL-Positivität zeitlich unmittelbar voraus.

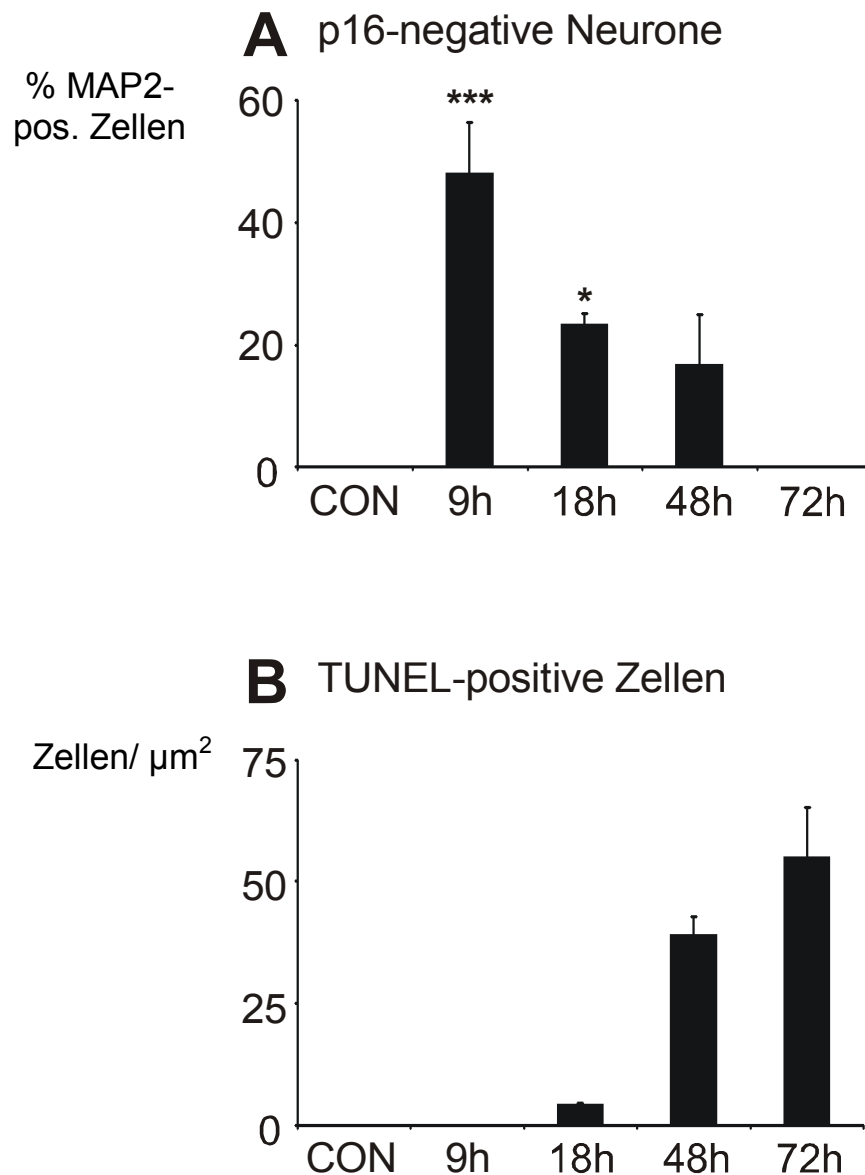


Abb. 7: Zeitverlauf der Herunterregulierung des CDK-Inhibitors $p16^{\text{INK4a}}$ (A) und des verzögerten neuronalen Zelltodes nach 30 min MCAo (B).

A: Die Anzahl der $p16^{\text{INK4a}}$ -negativen Neurone ist als Prozentsatz von allen MAP2-positiven Neuronen (vertikale Achse) zu unterschiedlichen Reperusionszeitpunkten (horizontale Achse) dargestellt. In den Kontrolltieren sowie zum Zeitpunkt 72 h waren alle MAP2-positiven Zellen $p16^{\text{INK4a}}$ -positiv. $N=3$; * $p<0.05$; *** $p<0.001$

B: Die Dichte der TUNEL-positiven Zellen pro μm^2 (vertikale Achse) ist zu unterschiedlichen Zeitpunkten (horizontale Achse) dargestellt. Zum Zeitpunkt 9 h wurden nur unregelmäßig einzelne TUNEL-positive Zellen nachgewiesen. Bei den Kontrolltieren wurden keine TUNEL-positiven Zellen detektiert. $N=3-6$

4.3.2 Expression von Cyclins D1 im ischämischen Striatum.

Die Expression von Cyclin D1, Cyclin E, Cyclin A sowie Cyclin B1 wurde immunhistochemisch zu den Zeitpunkten 9h, 18h, 48h und 72h nach Ischämie untersucht. Im Gegensatz zu Kontrollhirnen, die keine Cyclin D1- Immunreaktivität aufwiesen, wurde in den ischämischen Hirnen zum Zeitpunkt 48 h die Expression von Cyclin D1 festgestellt. Die Doppelfärbungen mit dem nukleären neuronalen Marker NeuN bestätigten sowohl die neuronale Herkunft als auch die nukleäre Lokalisation des Signals (Farbabb. 8 A-C, s. Seite 89).

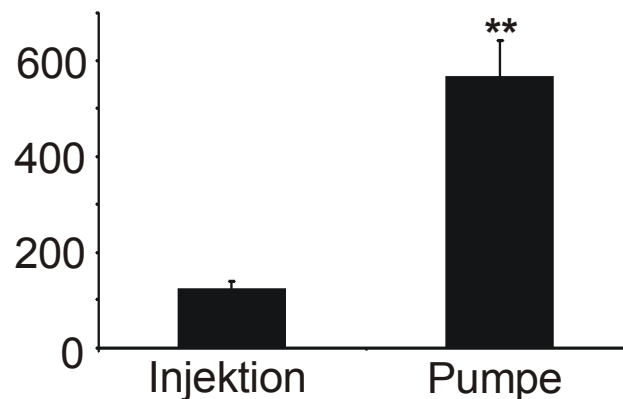
4.3.3 BrdU-Inkorporation in die DNA als Marker der S-Phase

5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) wird als ein Thymidinanalogon in die replizierende DNA eingebaut und gilt somit als ein Marker der S-Phase. Zwei unterschiedliche parenterale Applikationsmodi stehen zur Verfügung:

- 1) kontinuierliche Verabreichung von BrdU mittels einer subkutan platzierten osmotischen Minipumpe und
- 2) diskontinuierliche (pulsatile) Verabreichung durch tägliche intraperitoneale Injektionen.

Bei der vergleichbaren täglichen Dosis ist im ersten Fall mit einem konstanten BrdU- Spiegel im Blut zu rechnen, während im zweiten Fall etwa 2-stündige BrdU- Spiegelspitzen unmittelbar nach der Injektion bei sonst sehr niedrigem Spiegel vorliegen sollten. Also besteht beim Injektionsmodus ein etwa 2-stündiges Angebot einer hohen BrdU-Konzentration, während es im Falle der Minipumpe zu einem konstanten Angebot von BrdU mit allerdings niedrigerer Konzentration kommt. Da in der Literatur kein Konsensus darüber besteht, welche dieser beiden Methoden für die Detektion des Eintritts in die S-Phase sensibler ist, wurden beide Applikationsmethoden miteinander verglichen. Dabei wurden 4 Tiere mit einer Minipumpe (1 g/ml/ kg Körpergewicht, Flußrate 1 µl/h, tägliche Gesamtdosis 24 mg/ kg Körpergewicht) und 4 Tiere mit einmaligen täglichen Injektionen (50 mg/ kg Körpergewicht) behandelt. Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen in ischämischen Striata 72 Stunden nach MCAo wurde als Maß für die Sensitivität der Detektion gewählt. Diese Anzahl betrug bei den mit einer Pumpe versorgten Tieren 408 ± 57 Zellen/ LPF pro Low-Power-Field (LPF) und 87 ± 14 Zellen bei den mit Injektionen

behandelten Mäusen (Abb. 8). Es wurden also signifikant mehr Zellen in den Striata von den Tieren detektiert, welchen BrdU mittels Minipumpe appliziert wurde ($p=0.002$). In Anbetracht dieser Ergebnisse wurde diese Applikationsmethode von BrdU -als in unserem Modell sensitivere Methode- für weitere Experimente gewählt.



*Abb. 8: Anzahl von BrdU- positiven Zellen im ischämischen Striatum 72 h nach MCAo pro LPF (vertikale Achse) nach täglicher BrdU-Injektion (linke Säule) bzw. Applikation mit Hilfe einer miniosmotischen Pumpe (rechte Säule) . N=4, ** $p<0.01$*

4.3.4 Detektion von BrdU-positiven Neuronen

BrdU-Inkorporation wurde immunhistochemisch zu den Reperusionszeiten 4 ½ , 9, 18, 27, 36, 48 und 72 Stunden nach der MCA-Okklusion analysiert. Die ersten BrdU-positiven Zellen erschienen in den von der Ischämie betroffenen Striata zum Zeitpunkt 36 h (Farbabb. 9 B, s. Seite 89). Die Zellzahl nahm zum Zeitpunkt 48 h zu und erreichte ihr Maximum bei 72 h (Farbabb. 9 C, s. Seite 89). Um die Frage zu beantworten, ob unter diesen BrdU-positiven Zellen ebenfalls Neurone vorhanden sind, wurde ischämisches Gewebe zum Reperusionszeitpunkt 72 h elektronenmikroskopisch untersucht. Die Vibratomschnitte wurden zuerst gegen BrdU mit DAB als Chromogen immunhistologisch gefärbt. DAB wurde dann in den Nuclei der BrdU-positiven Zellen elektronenmikroskopisch detektiert werden. Es wurden BrdU-positive Zellen mit neuronaler Morphologie nachgewiesen (Farbabb. 10, s. Seite 89). Als Kriterien wurden

- 1) ein zentraler Nukleus mit einem prominenten Nucleolus
- 2) zytoplasmatische Vesikel

definiert (Graham, 1997). Eine genaue Quantifizierung solcher Zellen im Sinne einer kompletten Auszählung ist methodisch nicht durchführbar (Professor Brück, Inst. für Neuropathologie, Charité, persönliche Mitteilung). Es konnte allerdings abgeschätzt werden, daß auf etwa 100 Neurone im ischämischen Striatum ein BrdU-positives Neuron entfiel.

4.3.5 Detektion von BrdU- und TUNEL-positiven Zellen

Zu den Reperusionszeitpunkten 36h, 48h und 72h wurden Doppelfärbungen TUNEL mit BrdU-Immunhistochemie durchgeführt. Doppeltgefärbte Zellen, die sowohl für TUNEL als auch für BrdU positiv waren, konnten zum Zeitpunkt 72h festgestellt werden. Die Ko-Lokalisation des Signals konnte am konfokalen Mikroskop durch Schichtung in der Z-Achse in 1 µm Abständen verifiziert werden (Farbabb. 11, s. Seite 91). Die Quantifizierung solcher Zellen zeigte, daß 0.96 ± 0.17 % (n=4) aller TUNEL-positiven Zellen BrdU-positiv waren. Dies zeigt, daß eine gewisse Fraktion der Zellen vor dem Zelltod in die S-Phase eingetreten ist. Wie bereits im Kapitel 4.1 demonstriert (Farbabb. 2 A-C, s. Seite 79), waren zum Zeitpunkt 72 h praktisch alle TUNEL-positive Zellen für den neuronalen Marker NeuN immunreaktiv. Es konnten keine TUNEL-positiven Zellen detektiert werden, die für gliale Marker positiv waren (Farbabb. 2 D-I, s. Seite 79). Zusammen betrachtet, implizieren diese Daten, daß TUNEL- und BrdU-doppelmehrte Zellen Neurone sind. Die TUNEL-BrdU-doppeltgefärbten Zellen sind also Neurone, die nach bzw. während ihrer DNA-Replikation untergegangen sind. Dieser Befund weist darauf hin, daß einige Neurone vor ihrem Untergang in die S-Phase des Zellzyklus eingetreten waren.

Weiterhin wurden die benachbarten Schnitte auf das Vorhandensein von NeuN-positiven mitotischen Figuren überprüft, die als Marker der M-Phase gelten (Zindy et al., 1999; Gu et al., 2000; Nowakowski und Hayes, 2001). Es konnten keine mitotischen Figuren festgestellt werden.

4.4 *In vitro*-Experimente

4.4.1 Expression der Zellzyklusproteine *in vitro*

Um die Zellzyklusaktivierung und den damit möglicherweise verbundenen neuronalen Zelltod nach einem hypoxischen Schaden weiter auf enzymatischer sowie pharmakologischer Ebene zu untersuchen, führten wir Experimente in der Zellkultur. Serum-freies Medium in der Kultur ermöglichten, den Gehalt der Gliazellen sehr niedrig zu halten (Harms et al., 2000; Lautenschlager et al., 2000), so daß Neurone studiert werden konnten. Zuerst wurde die neuronale Expression verschiedener Zellzyklus-relevanter Proteine in der intakten Zellkultur immunhistochemisch und mittels Western-Blotting analysiert. Parallel zu den *in vivo*-Experimenten wurden immunhistochemische Färbungen an fixierten Zellkulturen gegen die CDK-Inhibitoren p16^{INK4a} sowie p27^{Kip1}, die Cycline Cyclin D1, Cyclin E, Cyclin A und Cyclin B1 und die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK2 durchgeführt. Alle Färbungen wurden als Doppelfärbung mit dem neuronalen Marker NeuN vorgenommen, um den neuronalen Ursprung des Signals zu bestätigen. Dabei wurde starke nukleäre Immunreaktivität für p27^{Kip1} festgestellt (Farbabb. 12 A-C, s. Seite 93), während das Signal für p16^{INK4a} -im Gegensatz zu den *in vivo*-Daten- nur schwach war. Im Einklang mit unseren *in vivo*-Daten konnte keine Immunreaktivität für Cyclin E, Cyclin A und Cyclin B1 erzielt werden. Die Färbung gegen Cyclin D1 ergab ein rein zytoplasmatisches Signal (Farbabb. 13 A-C, s. Seite 95). Die Expression von p27^{Kip1}, p16^{INK4a} und Cyclin D1 wurde in Western blots bestätigt (Farbabb. 15, s. Seite 97).

4.4.2 Schadensmodelle *in vitro*

Als hypoxisches Schadensparadigma wurde eine 90-minütige Sauerstoff- und Glukose-Deprivation (OGD) der primären neuronalen Zellkultur gewählt. Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, daß der Zelluntergang 24 h nach OGD sein Maximum erreicht (Bruer et al., 1997; Harms et al., 2000). Der neuronale Zelltod wurde in der Phasenkontrast-Mikroskopie sowie durch Messung der LDH-Freisetzung evaluiert. Für immunhistochemische Färbungen wurden Zeitpunkte 2 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h nach OGD, für Western blotting 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h gewählt.

4.4.3 Expression von CDK-Inhibitoren in Neuronen nach OGD

Um Veränderungen im Expressionsmuster des konstitutiv exprimierten zellzyklusinhibierenden Proteins $p27^{Kip1}$ nach 90-minütiger Sauerstoff-Glukose-Deprivation (OGD) zu analysieren, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen gegen $p27^{Kip1}$ sowie den neuronalen Marker NeuN durchgeführt. Bereits 2 h nach OGD konnte eine deutliche Reduktion der $p27^{Kip1}$ -Immunreaktivität festgestellt werden (Farbabb. 12 D-I, s. Seite 93). Um den $p27^{Kip1}$ -Verlust zu bestätigen und zu quantifizieren, wurden Western Blots zu den Zeitpunkten 2h, 4h, 6h, 12h, 24h und 48h nach OGD durchgeführt. Die semiquantitative Analyse der Abbildungen der Immunblots ergab eine signifikante Reduktion der $p27^{Kip1}$ -Expression zum Zeitpunkt 2h (Abnahme der Signalintensität um 34.6 ± 9.0 % im Vergleich zu Kontrollkulturen, $p < 0.01$) bzw. 4h (Abnahme um 57.2 ± 6.5 %, $p < 0.001$) (Farbabb. 15 B, s. Seite 97). Eine Abnahme des $p16^{INK4a}$ -Signals wurde ebenfalls nach OGD festgestellt, wobei hier bei einer schwächeren basalen Expression eine signifikante Herunterregulierung (Reduktion um 44.9 ± 9.9 %, $p < 0.001$) erst zum Zeitpunkt 4h nach OGD festzustellen war (Farbabb. 15 A, s. Seite 97). Die Herunterregulierung der CDK-Inhibitoren fand also bereits 2 bzw 4 h nach OGD statt und ging dem neuronalen Zelltod, der zum Zeitpunkt 24 h sein Maximum erreichte, voraus.

4.4.4 Expression von Cyclin D1 nach OGD

Um eine mögliche Progression in die G_1 -Phase des Zellzyklus zu untersuchen, wurde die Expression und die intrazelluläre Lokalisation von Cyclin D1 immunhistochemisch und mittels Western Blotting analysiert. Cyclin D1 ist im Zytosol inaktiv und bedarf einer Translokation in den Nukleus, wo es Cyclin-abhängige Kinasen aktiviert (Yang und Kornbluth, 1999). Ab dem Zeitpunkt 4 h nach OGD wurde ein nukleäres Cyclin D1-Signal in den Neuronen festgestellt (Farbabb. 13 D-F, s. Seite 95). Die Lokalisation von Cyclin D1 im Nukleus wurde am konfokalen Mikroskop durch Schichtbilder in der Ebene senkrecht zu den Zellen (z-Ebene) in 1 μ m-Abständen bestätigt (Farbabb. 14 A, s. Seite 95). Die Western Blot-Analysen ergaben eine signifikante Zunahme der Cyclin D1-Menge in Zelllysaten nach OGD ($p < 0.05$ ab 6 h, $p < 0.001$ ab 12 h) (Farbabb. 14 B, s. Seite 95).

4.4.5 Katalytische CDK-Aktivität nach OGD

Die CDK2-Aktivierung wurde nach OGD untersucht. Die katalytische Aktivität dieser Enzyme wurde mittels eines Histonkinase-Assays gemessen. Die basale Aktivität der intakten unstimulierten Kulturen betrug 438 ± 32 cpm ($n=3$). 12 h nach OGD stieg der Wert der Kinase-Aktivität auf 2885 ± 19 cpm (= counts per minute) ($n=3$), was einer prozentualen Zunahme um $658,3 \pm 4,3$ % ($p < 0,05$) entspricht. 24 h nach OGD betrug die Aktivität 5133 ± 603 cpm ($n=3$, Zunahme im Vergleich zur Kontrolle um $1171,0 \pm 137,5$ %, $p < 0,01$). Die Vorbehandlung mit 10 μ M Olomoucine konnte die Zunahme der CDK-Aktivität komplett aufheben: CDK2-Aktivität 12 h nach OGD mit Olomoucine: 980 ± 240 cpm, CDK2-Aktivität 24 h nach OGD mit Olomoucine: 422 ± 25 cpm (Unterschiede zur basalen Aktivität nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 9).

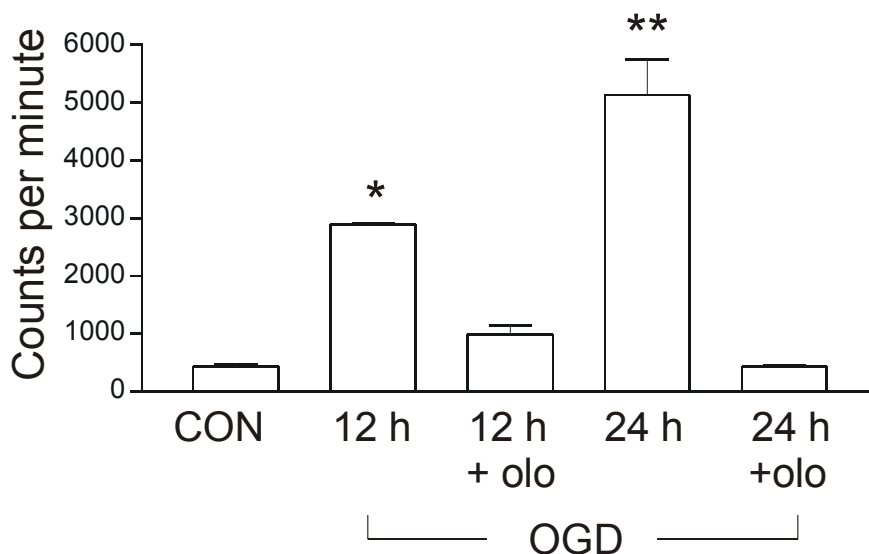


Abb. 9: CDK2-Aktivität in der primären neuronalen Zellkultur nach 90 minutiger OGD. Anti-CDK2-Immunpräzipitate wurden mit [γ - 32 P]ATP und Histon H11S als Substrat inkubiert. Das radioaktive Signal wurde dann mit einem Phosphorimager und TINA software quantifiziert. $N=3$, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ vs Kontrolle.

4.4.6 Pharmakologische Studien mit Olomoucine

Um die Hypothese zu prüfen, ob die CDK-Aktivierung und die damit verbundene Zellzyklusaktivität zum neuronalen Zelltod beitragen kann, wurde die Wirkung des synthetischen CDK-Inhibitors Olomoucine analysiert. Olomoucine inhibiert CDK1, CDK2 und CDK4 und blockiert dadurch die G1→S-Transition (Vesely et al., 1994; Abraham et al., 1995). Die kortikalen Kulturen wurden 1 Stunde vor OGD mit Olomoucine in den Konzentrationen 1, 10 und 100 μM vorbehandelt. Der Zellschaden wurde in der Phasenkontrastmikroskopie evaluiert und mittels LDH-Messung im Medium quantifiziert. Die Gabe von Olomoucine in der Konzentration von 10 μM und 100 μM erzielte einen signifikanten Schutz der Neurone nach OGD (Tabelle 3, Abb. 10, Farbabb. 16, s. Seite 97).

Tabelle 3:

24 h nach OGD	Vehikel	1 μM Olomoucine	10 μM Olomoucine	100 μM Olomoucine
Δ LDH (U/ ml Medium)	41,5	32,1	9,2	14,1
SEM	7,6	8,1	2,6	2,6
Signifikanz		nicht signifikant	$p < 0.01$	$p < 0.05$

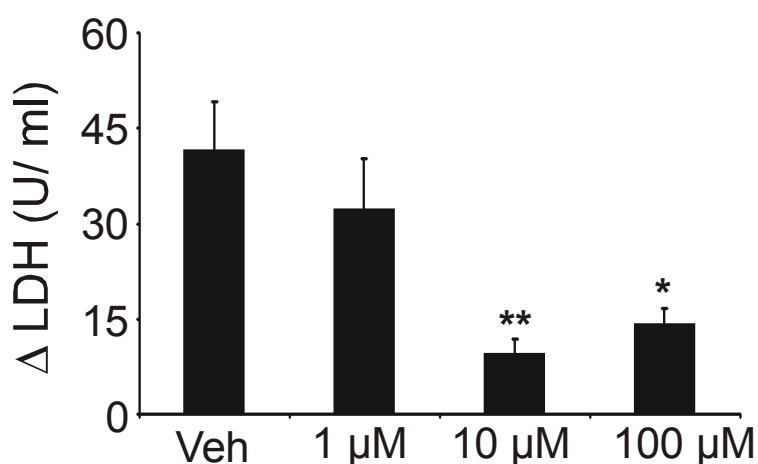


Abb. 10: Protektion einer primären neuronalen Zellkultur nach OGD mit dem synthetischen CDK-Inhibitor Olomoucine. Quantitative Messung des neuronalen Zellschadens mittels LDH-Konzentration im Medium 24 h nach OGD. $N=3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ vs Vehikel (Veh)

5. Diskussion

5.1 Zentraler Befund

Zentraler Befund der vorliegenden Arbeit ist eine Zellzyklusaktivierung postmitotischer neuronaler Zellen nach milder fokaler Ischämie. Als mögliches initiierendes Ereignis wurde die spezifische Herunterregulierung der CDK-Inhibitoren p16^{INK4a} bzw. p27^{Kip1} identifiziert. Hierbei fanden wir Anhalt für eine Progression in die G1- bzw. S-Phase des Zellzyklus in den Neuronen. Zumindest ein kleiner Anteil (ca. 1%) der untergehenden Neurone war in die S-Phase eingetreten. Da keine in der G₂-bzw. M-Phase befindlichen Neurone detektiert wurden, kann man aufgrund dieser Daten annehmen, daß die neuronale Aktivierung von Zellzyklus-relevanten Molekülen nach einem ischämischen Insult nicht zur Zellproliferation sondern zum Zelltod führt. Somit stellt die Zellzyklusaktivierung einen möglichen Mechanismus des verzögerten neuronalen Zelltodes nach Ischämie dar.

Unterstützend zu den *in vivo*-Daten fanden wir Hinweise für Aktivierung des Zellzyklus ebenfalls *in vitro* im Modell der Sauerstoff-Glukose-Deprivation der primären neuronalen Zellkultur. Hierbei konnte nicht nur die Expression von zellzyklusaktivierenden Enzymen sondern auch direkt ihre katalytische Aktivität gemessen werden. Die nach OGD detektierte Aktivitätszunahme konnte mit dem synthetischen CDK-Inhibitor Olomoucine fast vollständig blockiert werden. Die Applikation von Olomoucine in gleicher Konzentration konnte die hypoxischen Neurone nach OGD signifikant schützen. Diese Daten weisen darauf hin, daß die Aktivierung von CDKs nach Hypoxie bzw. Ischämie zum neuronalen Schaden beiträgt.

Unserer Meinung nach haben die Ergebnisse Bedeutung für das Verständnis der Zellzyklusbiologie postmitotischer Zellen, für die Pathophysiologie des verzögerten neuronalen Zelltodes sowie therapeutische Optionen nach Schlaganfall.

5.2 Einordnung des Befundes in die Biologie von postmitotischen Neuronen

Neurone des adulten Gehirns sind terminal differenzierte postmitotische Zellen. Die terminale Differenzierung setzt den Ausstieg aus dem Zellzyklus voraus (Ross, 1996), ein Vorgang, der klassischerweise als irreversibel betrachtet wird. Der genaue Mechanismus, der die Neurone im postmitotischen Zustand festhält, ist allerdings nicht geklärt (Raina et al., 1999). Unsere Daten legen die Vermutung nahe, daß die Expression von CKIs $p16^{\text{INK4a}}$ *in vivo* bzw. $p27^{\text{Kip1}}$ *in vitro* zumindest einen Bestandteil dieses Mechanismus darstellt. Zwei Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin:

- 1) Alle Neurone im intakten Striatum *in vivo* und in der primären neuronalen Zellkultur *in vitro* exprimieren diese CKIs.
- 2) Der Verlust des jeweiligen CKI geht der Zellzyklusaktivierung unmittelbar voraus. In der Tat wurde die spezifische $p16^{\text{INK4a}}$ -Herunterregulierung in den Neuronen zeitlich vor dem Eintritt in die S-Phase detektiert. Analog wurde der $p27^{\text{Kip1}}$ -Verlust vor der CDK-Aktivierung in der Zellkultur festgestellt.

Der Verlust des entsprechenden CKI ist also für die Zellzyklusaktivierung (mit)verantwortlich. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung von Miyazawa und Mitarbeitern, daß $p27^{\text{Kip1}}$ in zerebellären Körnervorläuferzellen kurz vor dem „Ausstieg“ aus dem Zellzyklus akkumuliert (Miyazawa et al., 2000). Die Expression von $p27^{\text{Kip1}}$ bleibt hoch im adulten Zerebellum. Die gleiche Arbeitsgruppe dokumentierte signifikant größere Zerebella von der $\text{Kip1}^{+/-}$ - und der $\text{Kip1}^{-/-}$ -Maus im Vergleich zum Wildtyp (Miyazawa et al., 2000).

Roussel und Mitarbeitern gelang es, eine Knock-out-Maus zu generieren, der sowohl $p27^{\text{Kip1}}$ als auch $p19^{\text{INK4d}}$ fehlen (Zindy et al., 1999). Diese Maus entwickelt am 10. postnatalen Tag (P10) schwerwiegende neurologische Symptome (Paresen, epileptische Anfälle, etc) und stirbt am 19. postnatalen Tag (P19). Somit muß sich die Untersuchung dieser Maus auf die ersten 19 Tage nach der Geburt beschränken. Die $\text{Kip1}^{-/-}$, $\text{INK4d}^{-/-}$ -Maus weist auffällig hohe neuronale Zellproliferation am P18 in verschiedenen Hirnarealen auf. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt findet sich in diesen Hirnregionen im Wildtyp keine Zellproliferation mehr statt. Diese Ergebnisse

untermauern die Bedeutung von CKIs p27^{Kip1} und p19^{INK4d} als physiologische Proliferationsinhibitoren.

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit untersuchten Legrier und Kollegen die Expression von Zellzyklusinhibitoren in verschiedenen Regionen des adulten Maushirns (Legrier et al., 2001). Sie detektierten p15^{INK4b} im Kortex und Striatum, während im Zerebellum die Expression von p27^{Kip1} dominant war. Diese Daten divergieren insofern von unseren Ergebnissen, als wir p16^{INK4a} als den prominenten CKI im Mausstriatum feststellten. Der Grund für diese Diskrepanz ist nicht ganz klar. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die unterschiedlichen Ergebnisse auf die unterschiedlichen Mausstämme (OF1 bei Legrier et al. und SV129 in unserem Labor) zurückgeführt werden können.

Eine andere interessante Besonderheit in der Expression von CKIs besteht darin, daß in unseren Modellen *in vivo* und *in vitro* CKIs in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wurden. Der Grund dafür kann am unterschiedlichen Alter von untersuchten Neuronen liegen. Die neuronale Zellkultur besteht nämlich aus embryonalen (am embryonalen Tag E17 entnommenen) Zellen, die 10-14 Tage in der Petrischale reifen. Gerade für den Zellzyklusausstieg von noch undifferenzierten neuronalen Zellen scheint p27^{Kip1} von großer Bedeutung zu sein (Zindy et al., 1999; Miayzawa et al., 2000). p16^{INK4a} wird aber in adulten Zellen hochreguliert (Zindy et al., 1997a). Seine Expression ist verbunden mit der Seneszenz und könnte den Ausdruck eines „reifen“ Zustandes der Zelle darstellen (Huschtscha und Reddel, 1999).

5.3 Einordnung des Befundes in die Pathologie des neuronalen Zelltodes

5.3.1 CKI-Verlust als initiiierendes Ereignis

Unsere Ergebnisse legen nahe, daß ein frühzeitiger Verlust von CDK-Inhibitoren (CKI) Zyklusprogression und daraufhin neuronalen Zelltod triggert. Die Herunterregulierung des jeweiligen CKI war spezifisch und nicht einfach ein Ausdruck des allgemeinen Proteinabbaus im Rahmen der Ischämie/ Hypoxie, denn p16^{INK4a}- bzw. p27^{Kip1}-negative Neurone waren morphologisch intakt und exprimierten das Zytoskelettprotein MAP2 („microtubule-associated protein 2“). MAP2 befindet sich in neuronalen Somata und Dendriten (Matus et al., 1981;

Caceres et al., 1984; Bernhardt und Matus, 1984). Nach Ischämie wird MAP2 in untergehenden Neuronen frühzeitig herunterreguliert und gilt somit als sensitiver Marker der Ischämie-induzierten Neurodegeneration (Kitawaga et al., 1989; Matesic und Lin, 1994). Somit fandete in unseren Modellen die spezifische Herunterregulierung von CKIs in (noch) intakten Neuronen statt.

In vivo fand die Herunterregulierung von p16^{INK4a} zu den Zeitpunkten 9 h und 18 h statt, während die ersten untergehenden TUNEL-positiven Zellen zum Reperusionszeitpunkt 24 h im Striatum erschienen. Analog regulierten hypoxische Neurone p27^{Kip1} zum Zeitpunkt 2 h bzw. p16^{INK4a} zum Zeitpunkt 4 h nach OGD herunter; die maximale Schädigung wurde in diesem Modell zum Zeitpunkt 24 h erreicht. Somit ging die Herunterregulierung von CKIs dem neuronalen Zelltod voraus. Der Verlust des jeweiligen CKI könnte als ein prädiktiver Faktor des verzögerten neuronalen Zelltores angesehen werden. Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigten Park und Kollegen, daß eine Überexpression von p16^{INK4a} und p27^{Kip1} mit Hilfe eines rekombinanten Sindbis-Virus kortikale und sympathische neuronale Zellkulturen gegenüber NGF-Deprivation sowie DNA-Schädigung durch UV-Licht und Cytosin Arabinosid (AraC) signifikant schützt (Park et al., 1997a, 1998). Ein weiterer Hinweis der protektiven Wirkung von p16^{INK4a} lässt sich aus den Studien von Gill und Windebank ableiten (1998), die die Cisplatin-Toxizität auf sensible Ganglienneuronen untersucht haben. Der neuronale Wachstumsfaktor NGF konnte über die Hochregulation von p16^{INK4a} die Cisplatin-induzierte Apoptose dieser Zellen verhindern.

Mehrere Studien an Hirntumoren belegen, daß der Verlust von endogenen CDK-Inhibitoren eine hinreichende Bedingung für unkontrollierte Zellproliferation darstellt (Nishikawa et al., 1995; Ueki et al., 1996). Besonders häufig wird ein mutationsbedingter Verlust der p16^{INK4a}- Expression in hochgradig malignen Gliomen festgestellt (Nishikawa et al., 1995). Diese Tumore sind nicht-neuronaler Herkunft. Diese Daten können also nicht ohne weiteres auf adulte Neurone direkt übertragen werden, weisen jedoch auf eine besondere Rolle von p16^{INK4a} als Zellzyklusinhibitor im adulten zentralen Nervensystem hin.

5.3.2 Nukleäre Expression von Cyclin D1 als weiterer CDK-aktivierender Schritt

Die Herunterregulierung von p16^{INK4a} bzw. p27^{Kip1} führt zur Dysinhibition von CDKs. Allerdings bedarf es eines weiteren –wohl davon unabhängigen- Schrittes, um die G1→S- Progression zu gewährleisten, und zwar die Cyclin-abhängige Aktivierung von CDKs (Sherr, 1993). Tatsächlich wurde von uns nukleäre Hochregulation von Cyclin D1 sowohl *in vivo* nach Ischämie als auch *in vitro* nach Hypoxie dokumentiert (Farbabb. 8, s.Seite 90, Farbabb. 13 und 14, s.Seite 96). Die Translokation in den Nukleus spielt insbesondere in unserem *in vitro*-Modell eine entscheidende Rolle. Cyclin D1 wird nämlich im Zytoplasma unter Ruhebedingungen in intakten Neuronen detektiert, wo es aber wahrscheinlich in Bezug auf den Zellzyklus keine funktionelle Bedeutung hat (Padmabhan et al., 1999; Yang und Kornbluth, 1999). Diese nukleäre Expression von Cyclin D1 nach Ischämie/ Hypoxie aktiviert - nach dem Verlust von p16^{INK4a}/ p27^{Kip1} - die Zellzyklusmaschinerie. Unsere Daten erweitern dabei frühere Berichte über Hochregulation von Cyclin D1 nach Ischämie/ Hypoxie (Guègan et al., 1997; Li et al., 1997a, 1997b, 1998; Timsit et al., 1999; Sakurai et al., 1999; Osuga et al., 2000).

5.3.3 CDK-Aktivierung nach Hypoxie

Um eine mögliche G1→S-Transition weiter zu untersuchen, wurde die Aktivität der CDK4 und CDK2 nach OGD in Zellkultur gemessen. Der wichtigste Vorteil der Serum-freien neuronalen Zellkultur besteht darin, daß der Anteil glialer Zellen gering ist (Lautenschlager et al., 2000). So kann bei Messung der enzymatischen Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen in den hypoxischen Neuronen der störende Einfluß von nicht-neuronalen Zellen minimiert werden. Diese Mitbeteiligung von Gliazellen am Gesamtsignal macht eine selektive Untersuchung der neuronalen CDK-Aktivität *in vivo* praktisch nicht durchführbar. Es wurde eine deutliche Zunahme der katalytischen Aktivität der Kinasen CDK2 zu den Zeitpunkten 12 h nach OGD detektiert. Unseres Wissens stellen diese Daten den ersten Hinweis einer CDK-Aktivierung in der primären neuronalen Zellkultur dar. Diese Aktivierung wurde fast vollständig durch Applikation vom synthetischen CDK-Inhibitor Olomoucine blockiert (Abb. 10, s. Seite 49).

5.3.4 DNA-Replikation als Hinweis für Eintritt in die S-Phase

Die Expression von Zellzyklus-relevanten Proteinen wie Cyclin D1 sowie Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen müßte nicht zwangsläufig eine Zellzyklusprogression bedeuten und könnte lediglich einen Ausdruck ihrer zusätzlichen Funktion in der apoptotischen Kaskade darstellen (Stefanis et al., 1999). Um die Zellzyklusprogression weiter zu analysieren, wurde das Thymidinanalogon 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) verwendet, welches an Stelle von Thymidin in die replizierende DNA eingebaut und immunhistochemisch nachgewiesen werden kann (Miller und Nowakowski, 1988; Nowakowski et al., 1993). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten BrdU-Dosen (bis max. 50 µg/gm Körpergewicht/Tag) wurden in mehreren unabhängigen Studien als nicht toxisch eingeschätzt (Gage et al., 1995; Gould et al., 1997; Liu et al., 1998; Kempermann et al., 1998). Der immunhistochemische Nachweis von BrdU gilt als Marker für DNA-Replikation sowohl im embryonalen als auch adulten Nervensystem (Thomaidou et al., 1997; Kempermann et al., 1997; ElShamy et al., 1998, Kornack und Rakic, 1999). Eine wichtige Fehlerquelle bei der Interpretation der Ergebnisse des BrdU-Einbaus besteht jedoch darin, daß BrdU potentiell sowohl während der Replikation als auch Reparatur inkorporiert werden kann. Mehrere Hinweise aus *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten belegen, daß die bei unseren Experimenten eingesetzte Detektionsmethode (BrdU-Applikation bis 50 µg/mg Körpergewicht/Tag und Immunhistochemie) für den Nachweis der DNA-Reparatur nicht ausreichend sensitiv ist und ausschließlich DNA-Replikation nachweist (Gobbel et al., 1998; Parent et al., 1999). Um die Frage eines möglichen Beitrages der DNA-Reparatur zur BrdU-Färbung gezielt zu beantworten, untersuchten Gage und Mitarbeiter nicht-mitotische mit 20 Gy bestrahlte Fibroblasten. In diesem Schadensparadigma entstehen nachweisbar DNA-Brüche, die innerhalb von 60 min repariert werden. Die Fibroblasten wurden dann der BrdU-Menge exponiert, die der Konzentration *in vivo* entsprach. Dabei konnte keine BrdU-Inkorporation detektiert werden (Palmer et al., 2000). Somit ist es wahrscheinlich, daß BrdU-Nachweis in unserem Modell ausschließlich DNA-Replikation widerspiegelt.

Eine weiterer variabler Faktor beim Nachweis von DNA-Replikation ist der Verabreichungsmodus von BrdU: tägliche intraperitoneale BrdU-Injektion versus kontinuierliche BrdU-Applikation mittels einer subkutanen Pumpe. Momentan

herrscht kein Konsensus darüber, welche Applikationsart sensitiver ist (PD Dr. Kempermann, Max-Delbrück-Centrum, Berlin, persönliche Mitteilung; Prof. Dr. Nowakowski, New Jersey Medical School, persönliche Mitteilung). In präliminären Experimenten wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, daß die kontinuierliche Methode mehr BrdU-positive Zellen im ischämischen Striatum zum Vorschein bringt. Bei dieser Applikationsmethode ist die maximale BrdU-Konzentration im Blut -wegen fehlender Peaks- wesentlich niedriger als bei der Injektionsmethode, so daß der „falsch-positive“ Nachweis von DNA-Reparatur noch unwahrscheinlicher wird.

DNA-Replikation ist ein sicherer Marker der S-Phase (S für DNA-Synthese). Der elektronenmikroskopische Nachweis der neuronalen DNA-Replikation bestätigte den Eintritt von Neuronen in die S-Phase nach Ischämie. Insgesamt blieb jedoch der Eintritt von Neuronen in die S-Phase ein seltenes Ereignis. Elektronenmikroskopisch mußten im Durchschnitt 100 bis 200 Neurone untersucht werden, um eine BrdU-positive Nervenzelle nachzuweisen. Wie die Doppelfärbung des Zelltodmarkers TUNEL mit BrdU zeigte, sind die meisten Neurone bereits vor der DNA-Replikation untergegangen, so daß ca. 1% aller TUNEL-positiven Zellen BrdU-positiv waren.

NeuN-positive mitotische Figuren gelten als Marker der Neurogenese (Mullen et al., 1992; Zindy et al., 1999; Gu et al., 2000). Die Tatsache, daß in unserem Modell keine NeuN-positiven mitotischen Figuren identifiziert werden konnten, weist darauf hin, daß BrdU-positive Neurone nicht neugebildete Zellen sind. Nach dem heutigen Wissensstand erscheint es ebenfalls unwahrscheinlich, daß die hier festgestellten BrdU-positiven Neurone aus den Vorläuferzellen stammen. Da die längste Dauer der BrdU-Applikation 72 h betrug, müßten dann BrdU-positive Zellen - falls sie aus den Vorläuferzellen stammen - sich in diesen 72 h in Neurone differenziert haben. Nach dem heutigen Kenntnisstand erscheint dies unwahrscheinlich (Kuhn et al., 1996; Palmer et al., 2000; PD Dr. Kempermann, Max-Delbrück-Centrum, Berlin, persönliche Mitteilung; Prof. Dr. Caviness, Harvard Medical School, persönliche Mitteilung). Ein Hinweis auf eine Migration von BrdU-positiven Zellen aus der subventrikulären Zone (SVZ), einem der physiologischen Entstehungsorte der Vorläuferzellen im adulten Gehirn, konnte ebenfalls nicht detektiert werden. Die zu diesem Zwecke separat durchgeführten und hier nicht dargestellten Experimente konnten keine Einwanderung von den SVZ-Zellen ins Infarktgebiet zeigen.

Der Nachweis von BrdU-positiven jedoch nicht neugebildeten Neuronen nach Ischämie liefert ein weiteres Argument dafür, daß neuronale DNA-Replikation nicht immer mit Neurogenese gleichzusetzen ist (Neve et al., 2000; Copani et al., 2001; Yang et al., 2001). In einem kürzlich erschienen Review weist Rakic – auch in Bezug auf unsere Arbeit - darauf hin, daß diese von vielen Autoren praktizierte Gleichsetzung möglicherweise zur Überschätzung der Beteiligung der Neurogenese sowohl im intakten als auch degenerierenden zentralen Nervensystem geführt hat (Rakic, 2002). Somit liefert die vorliegende Arbeit weitere Hinweise zur Interpretation der BrdU-Positivität in den neuronalen Zellen.

5.3.5 Protektive Wirkung des Zellzyklusinhibitors Olomoucine nach Hypoxie

Zur Klärung, ob Zellzyklusaktivierung nach Ischämie/Hypoxie nun protektiv oder schädlich ist, wurde die Wirkung vom CDK-Inhibitor Olomoucine *in vitro* nach OGD untersucht. Im Vergleich zu unserem *in vivo*-Modell bietet die primäre neuronale Zellkultur mehrere Vorteile für pharmakologische Studien: Zum einen wird das Problem der Blut-Hirn-Schranke für viele synthetische Zellzyklusinhibitoren wie z. B. Olomoucine durch direkte Applikation des Stoffs in das Inkubationsmedium umgangen. Die jeweils lokal wirkende Konzentration kann dabei genau dosiert werden. Zum anderen fallen Effekte, die primär nicht-neuronale Zellen betreffen, nicht mehr ins Gewicht. So zeigten Wiessner und Mitarbeiter z. B. eine Induktion von Cyclin D1-mRNA in Mikroglia nach globaler transienter Ischämie in der Ratte (Wiessner et al., 1996). Diese Induktion von Cyclin D1 in Mikroglia nach globaler transienter Ischämie in der Ratte wurde auf der Proteinebene bestätigt (Small et al., 2001). Unsere präliminären Daten zeigten ebenfalls Expression von Zellzyklus-relevanten Proteinen in Gliazellen. Proliferation sowie Einwanderung von Glia- bzw. Entzündungszellen findet nach Ischämie statt (Feuerstein et al., 1998; Lehrmann et al., 1997; Schroeter et al., 1999). Die Applikation von Olomoucine *in vivo* würde somit auch die inflammatorische Proliferation von diesen Zellen hemmen. Dies ist bei der Interpretation der schützenden Wirkung von Olomoucine insofern besonders relevant, als Entzündungshemmung nach Ischämie *per se* als protektiv gilt (Chen et al., 1994; Chopp et al., 1994; DeGraba, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Protektion von Neuronen durch Olomoucine nach OGD gezeigt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten (s. Tabelle 4).

Tabelle 4:

<i>CDK-Inhibitoren</i>	<i>Zelltyp</i>	<i>Schadensmodell</i>	<i>Literatur</i>
Olomoucine Flavopiridol, Roscovitine	sympathetische Neurone	NGF-Deprivation	Park et al., 1996
Olomoucine, Flavopiridol	zerebelläre Körnerzellen	K ⁺ -Deprivation	Padmanabhan et al., 1999
Olomoucine	embryonale Vorderhirnneurone	Hypoxie	Bossenmeyer-Puorié et al., 1999

Vor kurzem wurde der erste Nachweis einer protektiven Wirkung von synthetischen CDK-Inhibitoren nach Ischämie *in vivo* erbracht. Park und Mitarbeiter konnten nach einer fokalen transienten Ischämie in der Ratte eine signifikante Protektion mit Flavopiridol erzielen (Osuga et al., 2000). Die intraventrikuläre Applikation von Flavopiridol in der Konzentration von 100 µM bzw 500 µM reduzierte dramatisch die Anzahl von TUNEL-positiven Zellen um 75% bzw. 90 %. Die Messungen des absoluten Blutflusses konnten keine Unterschiede zwischen den mit dem CDK-Inhibitor bzw. Placebo-behandelten Tieren aufdecken, so daß die Autoren von einem direkt neuroprotektiven Effekt des synthetischen CDK-Inhibitor ausgingen. Insgesamt können also synthetische CDK-Inhibitoren zur Zeit –unter Berücksichtigung ihrer ebenfalls anti-inflammatorischen Wirkung- im Tierversuch als neuroprotektiv eingestuft werden.

5.3.6 Zellzyklusaktivierung als Bestandteil neuronaler Todeskaskaden

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten liefern weitere Hinweise auf die Beteiligung des Zellzyklus beim neuronalen Zelltod. Theoretisch könnte es sich dabei aber lediglich um ein Epiphänomen handeln (Hayashi et al., 1999). Aus 2 Gründen belegt jedoch die vorliegende Arbeit eindeutig die funktionelle Bedeutung der Zellzyklusaktivierung beim neuronalen Tod:

- 1) Die Expression der Zellzyklus-relevanten Proteine sowie DNA-Replikation findet zeitlich vor dem zellulären Untergang statt.
- 2) Die Hemmung des Zellzyklus erzielt eine signifikante Protektion.

Allerdings muß diese in einer postmitotischen Zelle unerwartete Zellzyklusaktivierung nicht unbedingt eine obligatorische bzw. exklusive Todeskaskade darstellen (Stefanis et al., 1999; Copani et al., 2001). Vielmehr kann die hier berichtete Zellzyklusaktivierung als einer mehrerer Mechanismen angesehen werden, die zum Erreichen der „Todesschwelle“ beitragen („Threshold-Prinzip“, Copani et al., 2001).

Die eigentlichen zellulären bzw. molekularen Mechanismen, die der CDK-Aktivierung bzw. dem Eintritt in die S-Phase folgen und die Ausführung des neuronalen Zelltodes vermitteln, bleiben unklar. Als besonders attraktive Kandidaten für die exekutiven Funktionen erscheinen dabei pro-apoptotische Moleküle. In der Tat sind Zellzyklusregulation und Apoptose eng miteinander verknüpft (King und Cidlowski, 1995; Evan et al., 1995; Kasten und Giordano, 1998). Bereits 1993 stellte Heintz die Hypothese auf, daß eine aberrante Aktivierung des Zellzyklus in Neuronen zur Anschaltung des programmierten Zelltodes führen könnte (Heintz, 1993). Meikrantz und Schlegel sehen die Apoptose an als „aberranten Eintritt in die S-Phase, welcher anstelle der DNA-Replikation zur Chromatinkondensation und –spaltung führt“ (Meikrantz und Schlegel, 1995).

Stefanis und Kollegen detektierten die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C sowie Aktivierung von Caspasen (Caspase-2 und –3) als Folge der CDK-Aktivierung im Modell der Camptothecin-induzierten Neurodegeneration. Die Applikation des CDK-Inhibitors Flavopiridol konnte sowohl Cytochrom-Freisetzung als auch Caspase-Aktivierung verhindern (Stefanis et al., 1999). Dies kann als Hinweis darauf interpretiert werden, daß Caspasen „downstream“ der CDK-Aktivierung agieren. Tatsächlich wurde die Aktivierung von Caspase-3 sowohl im Modell der transienten MCA-Okklusion *in vivo* (Namura et al., 1998; Endres et al., 1998) als auch nach OGD *in vitro* (Nath et al., 1998; Harms et al., 2000) nachgewiesen. Somit könnte die Caspase-Aktivierung eine Verbindung zwischen der CDK-Aktivierung und dem verzögerten neuronalen Zelltod darstellen (Abb. 11).

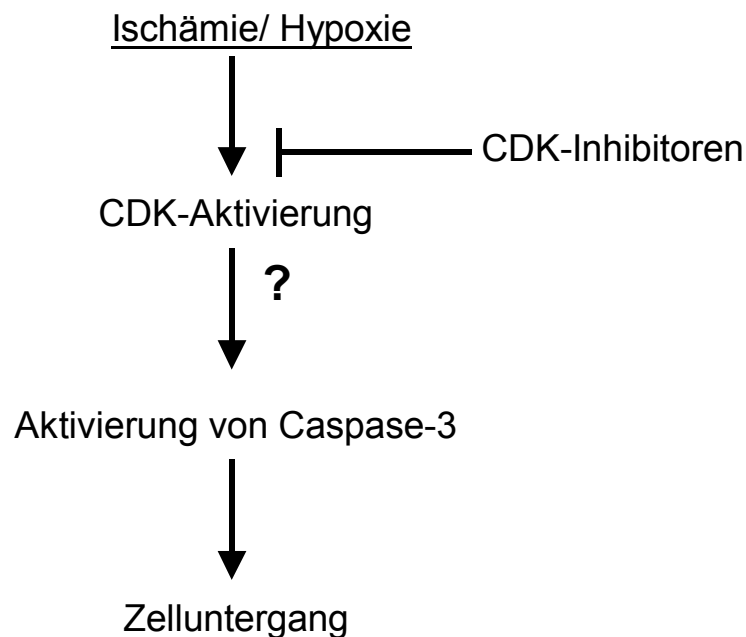


Abb. 11: Hypothetisches Modell der zellulären Todeskaskade nach der ischämisch bedingten CDK-Aktivierung (In Anlehnung an Stefanis et al., 1999)

5.3.7 Beteiligung aberranter Zellzyklusaktivierung bei weiteren ZNS-Erkrankungen

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß Neurone Zellzyklus-relevante Moleküle nach Ischämie exprimieren (Guégan et al., 1997; Li et al., 1997; Li et al., 1998). Allerdings war unklar, welche mögliche funktionelle Bedeutung dieses Phänomen hat. Während Guégan und Kollegen von einem Zelltod-induzierenden Effekt dieser aberranten Expression von Zellzyklusmolekülen ausgingen, vertraten Li und Mitarbeiter die Meinung, daß die Expression dieser Molekülen vielmehr einen regenerationsfördernden Prozeß anzeigt. Wie oben erläutert, weisen unsere Befunde darauf hin, daß die nach Ischämie stattfindende Zellzykluswiederaktivierung zum neuronalen Zelltod führt. Interessanterweise sind vergleichbare Zusammenhänge bei der häufigsten neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer dokumentiert worden (Vincent et al., 1997; Nagy et al., 1997; Nagy et al., 1998; Busser et al., 1998; McShea et al., 1999; Yang et al., 2001).

Die Degeneration im Rahmen der Alzheimer-Krankheit ist durch den selektiven Verlust von neuronalen Zellen in verschiedenen Hirnarealen

gekennzeichnet (Katzman, 1986). Dabei liegt eine für die Krankheit spezifische regionale Variabilität der Hirnatrophie vor (Mann, 1991). Ein wahrscheinlicher Pathomechanismus dieses Zellunterganges scheint ebenso die Zellzyklusaktivierung in postmitotischen Neuronen zu sein. Im Rahmen autoptischer Studien berichteten Vincent und Mitarbeiter 1997 über aberante Expression von CDK1 in degenerierenden Neuronen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten (Vincent et al., 1997). Herrup und Mitarbeiter detektierten selektive Expression von Cyclin D, CDK4 und Cyclin B1 im Hippocampus, Subiculum, Locus coeruleus und Raphe dorsalis, also in den Regionen, in denen bei der Alzheimer-Krankheit Neurodegeneration stattfindet (Busser et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde keine Immunreaktivität für diese Proteine in den entsprechenden Arealen von Kontrollhirnen gleichen Alters festgestellt. Außerhalb der betroffenen Hirnarealen konnte in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten ebenfalls keine Expression von diesen Molekülen nachgewiesen werden. Der gleichen Arbeitsgruppe gelang es vor kurzem, den Zellzyklus-Wiedereinstieg von postmitotischen Neuronen im Gehirn der Alzheimer-kranken Patienten direkt zu visualisieren (Yang et al., 2001). Mit Hilfe von „fluorescent *in situ* hybridization“ (FISH) konnten hippocampale polyploide Neurone ausschließlich in den Alzheimer-befallenen Gehirnen nachgewiesen werden. In diesen Neuronen lag das ganze Genom dupliziert vor. Dieser Befund belegt eindeutig eine stattgefundene DNA-Replikation und somit einen Eintritt in die S-Phase. Gleichzeitig konnten jedoch keine mitotischen Figuren dokumentiert werden. Die Autoren schlossen daraus, daß die betroffenen Neurone in die S-Phase eingetreten aber –noch vor dem Eintritt in die M-Phase- untergegangen sind. Diese Befunde stehen somit gänzlich im Einklang mit unseren Daten.

Interessanterweise wurde vor kurzem eine aberante Expression von Zellzyklusproteinen -einschließlich E2F-1 und der hyperphosphorylierten Form des Retinoblastoma-Proteins- im ZNS von Patienten mit HIV-Enzephalitis detektiert (Jordan-Sciutto et al., 2002). Die Tatsache, daß Zellzyklusaktivierung bei solch unterschiedlichen zerebralen Pathologien wie akuter Ischämie (Mediainfarkt), langsamer Neurodegeneration (Alzheimer-Krankheit) und chronischer Entzündung (HIV-Enzephalitis) nachgewiesen wird, weist darauf hin, daß es sich hierbei um einen allgemeinen Pathomechanismus der neuronalen Schädigung handelt.

Ausgehend von diesen Daten könnte eine Hemmung dieser Zellzyklusaktivierung eine therapeutische Option des akuten Schlaganfalls darstellen.

5.4 Schlaganfall-Therapie

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Protektion von kortikalen neuronalen Zellen nach einem hypoxischen Insult (OGD) durch Applikation vom synthetischen Zellzyklusinhibitor Olomoucine festgestellt. Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigten Park und Mitarbeiter eine beeindruckende Neuroprotektion durch den Zellzyklusinhibitor Flavopiridol nach Ischämie *in vivo* (Osuga et al., 2000). Somit können synthetische Zellzyklusinhibitoren ein Therapeutikum in der akuten Behandlung vom Schlaganfall darstellen. Insbesondere könnte das Ausmaß der ischämischen Schädigung im Bereich der sog. Penumbra dadurch reduziert werden. Die Hypothese, daß Zellzyklusinhibition vor allem im Bereich der Penumbra eine protektive Wirkung entfaltet, erscheint besonders plausibel. In dieser Arbeit wurde die degenerative Wirkung der Zellzyklusaktivierung in postmitotischen Neuronen in einem Modell der „milden“ Ischämie in der Maus gezeigt. Diese milde Ischämie ist charakterisiert durch

- 1) selektiven neuronalen Zelluntergang von besonders vulnerablen Projektionsneuronen bei relativer Aussparung von Interneuronen und Gliazellen sowie
- 2) zeitliche Verzögerung des neuronalen Zelltodes mit einem Maximum bei 72 h nach der arteriellen Okklusion.

Diesen Charakteristika nach entspricht dieses Modell teilweise dem Konzept der Penumbra bzw. elektiver Parenchymnekrose („incomplete infarction“; Lassen, 1982; Garcia et al., 1996; Heiss, 2000). Somit könnten die in dieser Arbeit vorgestellten Vorgänge auch beim humanen Schlaganfall eine Rolle spielen. Allerdings bestehen momentan folgende Einschränkungen im Hinblick auf einen baldigen klinischen Einsatz:

- 1) Neuroprotektive Wirkung von synthetischen CDK-Inhibitoren nach Ischämie wurden bis dato nur in der Maus untersucht. Weitere unabhängige Studien in anderen Spezies sind erforderlich, die diese Wirkung bestätigen würden.

- 2) Die Bedeutung von Zellzyklusvorgängen bei akuter Ischämie im Menschen wurde noch nicht systematisch untersucht. Die Schwierigkeit solcher Studien besteht darin, daß –tierexperimentellen Daten nach- vor allem im Penumbrabereich eine Zellzyklusaktivierung zu erwarten wäre. Allerdings sind es ausgedehnte (vollständige) Mediainfarkte bzw. große Infarkte im hinteren Stromgebiet, die rasch letal verlaufen und somit autopsisch untersucht werden können (Victor und Ropper, 2001). Ob eine neuroprotektive Strategie bei solchen Infarkten ebenfalls Erfolge verspricht, ist noch nicht geklärt.
- 3) Die bis dato in der Forschung breit eingesetzten Zellzyklusinhibitoren Olomoucine, Roscovitine und Flavopiridol sind nicht Blut-Hirn-Schranken-gängig. Die Notwendigkeit einer intrathekalen bzw. intraventrikulären Verabreichung des Medikamenten würde den Einsatz beim Menschen aus praktischen Gründen nicht realisierbar machen. Zur Zeit wird an der Entwicklung Blut-Hirn-Schranken-gängiger Substanzen gearbeitet (Prof. Dr. Hajduch, Olomouc Medical School, persönliche Mitteilung).
- 4) Systemisch verabreichte Zellzyklusinhibitoren würden alle Zellen im Organismus erfassen. Nebenwirkungen, die vor allem proliferierende Zellen betreffen würden, können gravierend sein. Erwartete Nebenwirkungen von Olomoucine beinhalten sowohl Frühreaktionen wie Erbrechen, Übelkeit und Schwitzen als auch Spätreaktionen, die insbesondere auf Beeinflussung der Erythro-, Leuko- und Thrombopoese, Beeinträchtigungen der Schleimhäute, hepatotoxische Wirkungen und teratogene bzw. mutagene Wirkungen beruhen (Diehl und Lathan, 1996). Das Ausmaß dieser bzw. weiterer bis dato nicht bekannter Nebenwirkungen könnte -bei systemischer Applikation- einen klinischen Einsatz verbieten.

Ein weiterer Aspekt ist die prinzipielle Schwierigkeit der Übertragbarkeit der im Tierversuch erhobenen Daten auf den Menschen. Während eine große Anzahl unterschiedlicher Substanzen im Tierversuch eine Reduktion des durch die Ischämie bedingten morphologischen Schadens bewirkt, konnte in über 80 größtenteils multizentrischen klinischen Studien mit über 30 Substanzen bisher kein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden (De Keyser et al., 1999; Block und Schwarz, 1999; DeGraba und Pettigrew, 2000). Zum Teil ist diese ausgeprägte Divergenz der experimentellen und klinischen Forschung darauf zurückzuführen, daß

jeweils unterschiedliche Spezies -Nagetiere versus Primaten- untersucht wurden. Weitere Faktoren, die diese Diskrepanz erklären könnten, sind unterschiedliche Zeitpunkte der Gabe des Therapeutikums sowie unterschiedliche Zeitpunkte und Art der Schadensevaluation im Tierversuch und in der klinischen Praxis. Trotz dieser Einwände sollen aber weiterhin die experimentellen Studien die Basis für klinische Studien bilden, da sie die am Zellschaden beteiligten pathophysiologischen Abläufe aufdecken (De Keyser et al., 1999).

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die pathogenetische Bedeutung von dynamischen Zellzyklusveränderungen nach transienter fokaler Ischämie zu analysieren.

Als *in-vivo*-Modell des humanen Schlaganfalls wurde eine 30-minütige Fadenokklusion der A. cerebri media (MCAo) in der Maus gewählt. In diesem Modell findet ein zeitlich verzögerter selektiver Zelluntergang von striatalen Projektionsneuronen bei relativer Aussparung von Gliazellen und Interneuronen statt. Somit entspricht dieses Modell dem humanpathologischen Konzept der „elektiven Parenchymnekrose“. Als *in-vitro*-Modell wurde eine 90-minütige Sauerstoff-Glukose-Deprivation (OGD) der primären neuronalen Zellkultur eingesetzt. Die Experimente wurden parallel *in vivo* und *in vitro* durchgeführt.

Wir konnten zeigen, daß alle adulten striatalen Neurone den zellzyklushemmenden CDK4-Inhibitor p16^{INK4a} *in vivo* exprimierten. Die spezifische Herunterregulierung dieses Inhibitors nach 30-minütiger „milder“ zerebraler Ischämie war ein frühzeitiger und zuverlässiger Indikator des verzögerten neuronalen Zellunterganges. Der Verlust von p27^{Kip1}, eines weiteren CDK-Inhibitors, ging dem Zelluntergang in der primären neuronalen Zellkultur nach OGD voraus. Der Verlust von CDK-Inhibitoren wurde von der Hochregulierung des Cyclin D1 begleitet. Cyclin D1 wurde in den Zellkern transloziert. Dieser Translokation folgte eine Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (CDK2). Wir postulieren, daß die Herunterregulierung der CDK-Inhibitoren das initiiierende Ereignis für die Zellzyklusaktivierung darstellt. Die Mehrzahl der Neurone wurde noch vor dem Eintritt in die S-Phase apoptotisch, wenngleich eine kleine Fraktion noch vor ihrem Untergang DNA synthetisierte. Die Behandlung mit dem synthetischen CDK-Inhibitor Olomoucine schützte die primäre neuronale Zellkultur signifikant vor OGD. In der Zusammenschau weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß die Zellzyklusaktivierung nach fokaler transienter Ischämie kausal mit der Schadensprogression verknüpft ist. Die pharmakologische Inhibition dieser Vorgänge könnte –unter Berücksichtigung der Nebenwirkungen der jeweiligen Pharmaka- einen therapeutischen Ansatz im Rahmen der akuten Schlaganfallbehandlung liefern.

7. Publikationen

Die Studien der vorliegenden Arbeit wurden teilweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

7.1 Originalarbeiten

Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Brück W, Hörtnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M (2001) Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci* 21: 5045-5053.

Harms C, **Katchanov J**, Hauck L, Herwig U, Engel F, Dirnagl U, Hörtnagl H, Endres M (2002) Loss of cyclin dependent kinase inhibitors as an early event of neuronal apoptosis induced by ethylcholine aziridium. *In Vorbereitung*.

Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Dirnagl U, Brück W, Veh RW, Endres M (2002) Specific neuronal vulnerability following mild focal brain ischaemia in the mouse. *In Vorbereitung*.

7.2 Abstracts

Katchanov J, Gertz K, Harms C, Priller J, Hirt L, Waeber C, Wiegand F, Brück W, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M (2000) Loss of p16 and subsequent S-Phase re-entry attempt following mild focal ischemia. *Soc. Neurosc. Abstr.* 26

Harms C, **Katchanov J**, Gertz K, Bhide PG, Dirnagl U, Hörtnagl H, Endres M (2000) Cell cycle re-entry induces neuronal apoptosis after mild oxygen- glucose-deprivation or ethylcholine aziridinium (AF64A) in vitro. *Soc. Neurosc. Abstr.* 26

Endres M, **Katchanov J**, Harms C, Gertz K, Moskowitz MA, Bhide PG, Dirnagl U (2000) Fehlregulation des Zellzyklus und neuronaler Zelltod. *Akt Neurol* 27 (Suppl I)

Endres M, **Katchanov J**, Harms C, Gertz K, Hauck L, Hörtnagl H, Bhide PG, Dirnagl U (2001) Loss of p16 and subsequent S-Phase re-entry attempt following mild focal ischemia *J Cereb Blood Flow Met* 21 Suppl 1

7.3 Weitere Publikationen

- Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, **Katchanov J**, Freyer D, Kapinya K, Herwig U, Megow D, Dirnagl U, Weber JR, Hortnagl H (2001) Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration J Neurosci 21:2600- 2609.
- Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, **Katchanov J**, Dirnagl U, Szabo C, Endres M. (2001) Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke Int J Mol Med 7:255-260.
- Hoffmann O, Klingebiel R, Braun JS, **Katchanov J**, Valdueza JM (2002) Diagnostic pitfall: atypical cerebral venous drainage via the vertebral venous system. AJNR Am J Neuroradiol 23(3):408-11.
- Isaev NK, Stelmashook EV, Dirnagl U, Andreeva NA, Manuhova L, Vorobjev VS, Sharonova IN, Skrebitsky VG, Victorov IV, **Katchanov J**, Weih M, Zorov DB (2002) Neuroprotective effects of the antifungal drug clotrimazole. Neuroscience 113(1):47-53.

8. Literaturverzeichnis

- Abraham RT, Acquarone M, Andersen A, Asensi A, Belle R, Berger F, Bergounioux C, Brunn G, Buquet-Fagot C, Fagot D, Glab N, Goudeau H, Goudeau M, Guerrier P, Houghton P, Hendriks H, Kloareg B, Lippai M, Marie D, Maro B, Meijer L, Mester J, Mulner- Lorillon O, Poulet SA, Schierenberg E, Schutte B, Vaultot D, Verlhac MH (1995) Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol Chem* 83:105-120.
- Berlit P (2000) Schlaganfall. *Nervenarzt* 71:231-237.
- Bernhardt R, Matus A (1984) Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol* 226(2):203-21.
- Bignami A, Dahl D (1977) Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia.. *J Histochem Cytochem* 25(6):466-9
- Black AR, Azizkhan-Clifford J (1999) Regulation of E2F: a family of transcriptional factors involved in proliferation control. *Gene* 237: 281-302.
- Block F, Schwarz M (1999) Neuroprotektion beim Schlaganfall. *Nervenarzt* 70: 101–110.
- Bossenmeyer-Puorié C, Chihab R, Schroeder H, Daval JL (1999) Transient hypoxia may lead to neuronal proliferation in the developing mammalian brain: from apoptosis to cell cycle completion. *Neuroscience* 91:221-231.
- Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W (1988). Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 8(4):474-85.
- Bruer U, Weih MK, Isaew NK, Meisel A, Ruscher K, Bergk A, Trendelenburg G, Wiegand F, Victorov IV, Dirnagl U (1997) Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* 414:117-121.
- Busser J, Geldmacher DS, Herrup K (1998) Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 18:2801-2807.

- Caceres A, Binder LI, Payne MR, Bender P, Rebhun L, Steward O (1984) Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J Neurosci* 4(2):394-410.
- Caviness VS Jr, Takahashi T, Nowakowski RS (1999) The G1 restriction point as critical regulator of neocortical neuronogenesis. *Neurochem Res* 24(4):497-506.
- Cervos-Navarro J, Schubert TE (1996) Pitfalls in the evaluation of apoptosis using TUNEL. *Brain Pathol* 6(3):347-8.
- Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y (1995) A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 7(1):61-64.
- Chen H, Chopp M, Zhang RL, Bodzin G, Chen Q, Rusche JR, Todd RF 3rd (1994) Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat. *Ann Neurol* 35(4):458-63.
- Chopp M, Zhang RL, Chen H, Li Y, Jiang N, Rusche JR (1994) Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25(4):869-75.
- Clarke A, Maandag E, van Roon M, van der Lugt N, van der Valk M, Hooper M, Berns A, te Riele H (1992) Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359: 328-330.
- Copani A, Uberti D, Sortino MA, Bruno V, Nicoletti F, Memo M (2001) Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci* 24(1): 25-31.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (1994) *Pathologic Basis of Disease*. 5. Aufl. Saunders Philadelphia
- Cramer SC, Chopp M (2000) Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci* 23:265-271.
- DeGraba TJ (1998) The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology* 51(3 Suppl 3): S62-8.
- DeGraba TJ, Pettigrew LC (2000) Why do neuroprotective drugs work in animals but not humans? *Neurol Clin* 18(2): 475-93.

- De Keyser J, Sulter G, Luiten PG (1999) Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci.* 22(12):535-40.
- Denhardt DT (1999) Signal transduction pathways and regulation of the mammalian cell cycle: cell type-dependent intergration of external signals. In Stein GS, Baserga R, Giordano A und Denhardt DT. *The molecular basis of cell cycle and growth control.* Wiley-Liss, New York
- Diehl V und Lathan B (1996) Grundlagen der internistischen Onkologie. *In* Gross, R, Schölmerich, P und Gerok W. *Die Innere Medizin.* 9. Aufl. Schattauer Stuttgart-New York
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22(9):391-7.
- Du C, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW (1996). Very delayed neuronal death after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* 16:195-201.
- EIShamy WM, Fridvall LK, Ernfors P (1998) Growth arrest failure, G1 restriction point override, and S phase death of sensory precursor cells in the absence of neurotrophin-3. *Neuron* 21:1003-1015.
- Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA (1998) Attenuation of delayed neuronal death after mild focal cerebral ischemia by inhibitors of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:238-247.
- Evan GI, Brown L, Whyte M, Harrington E (1995) Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 7(6):825-34.
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1998) Inflammatory mediators of ischemic injury: cytokine gene regulation in stroke. *In* Ginsberg MD und Bogousslavsky J *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis and Management.* Blackwell Science, Malden.
- Fink K, Zhu J, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Endres M, Ma J, Yuan J, Moskowitz MA (1998) Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage due to delayed caspase-3 activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1071-1076.

- Fisher CM (1951) Occlusion of the internal carotid artery. *Arch Neurol Psychiatry* 65:345-377.
- Fisher M, Garcia JH (1996) Evolving stroke and the ischemic penumbra. *Neurology* 47:884-888.
- Freeman RS, Estun S, Johnson EM (1994) Analysis of cell cycle-related gene expression in post-mitotic neurons: selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* 12:343-355.
- Funk JO, Kind P (1997) Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs. *Hautarzt* 48:157-165.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhnen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J (1995) Survival and differentiation of adult progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11879-11883.
- Garcia JH und Kamijyo Y (1974) Cerebral infarction: Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 33:408-421.
- Garcia JH, Liu K-F, Ho K-L (1995) Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervalls in the caudoputamen and the cortex. *Stroke* 26:636-643.
- Garcia JH, Lassen NA, Weiller C, Sperling B, Nakagawara J (1996) Ischemic stroke and incomplete infarction. *Stroke*. 27(4):761-5.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3):493-501
- Gill JS, Windebank AJ (1998) Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J Clin Invest* 101:2842-2850.
- Ginsberg MD, Pulsinelli WA (1994) The ischemic penumbra, injury thresholds and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol* 36: 553-554.
- Gobbel GT, Bellinzona M, Vogt AR, Gupta N, Fike JR, Chan PH (1998) Response of postmitotic neurons to X-radiation: implications for the role of DNA damage in neuronal apoptosis. *J Neurosci* 18:147-155.

- Goldberg MP and Choi DW (1990) Intracellular free calcium increases in cultured cortical neurons deprived of oxygen and glucose. *Stroke* 21:11175-11177.
- Goldberg MP and Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell cultures: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J. Neurosci* 13: 3510-3524.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17:2492-2498.
- Graham DI. [Hrsg.] (1997) *Greenfield's neuropathology*. 6. Aufl. Arnold, London
- Gu W, Brannstrom T, Wester P (2000) Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1166-1173.
- Guégan C, Lévy V, David J-P, Ajchanbaum-Cymbalista F, Sola B (1997) c-Jun and cyclin D1 proteins as mediators of neuronal death after focal ischaemic insults. *NeuroReport* 8:1003-1007.
- Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Freyer D, Weih MK, Dirnagl U, Weber JR, Hörtnagl H (2000) Melatonin is protective in necrotic but not in caspase-dependent, free-radical-independent apoptotic neuronal cell death in primary cortical cultures. *FASEB J* 14:1814-1824.
- Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Itoyama Y (1999) DNA fragmentation precedes aberrant expression of cell cycle-related protein in rat brain after MCA occlusion. *Neurol Res* 21(7):695-8.
- Heintz N (1993) Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem Sci* 18:157-159.
- Heiss WD (2000) Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(9):1276-93.
- Herrup K, Mullen RJ (1979) Regional variations and absence of large neurons in the cerebellum of the staggerer mouse. *Brain Res* 172:1-12.
- Herrup K, Busser JC (1995) The induction of multiple cell cycle events precedes target-related neuronal death. *Development* 121:2385-2395.

- Ho MK, Springer TA (1982) Mac-1 antigen: quantitative expression in macrophage populations and tissues, and immunofluorescent localization in spleen. *J Immunol* 128(5):2281-6.
- Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36: 557-565.
- Hudgins WR, Garcia JH (1970) Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for the experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke* 1(2):107-111.
- Huschtscha LI, Reddel RR (1999) p16INK4a and the control of cellular proliferative life span. *Carcinogenesis* 20:921-926.
- Jacks T, Fazeli A, Schmitt E, Bronson R, Goodell M, Weinberg R (1992) Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359: 295-300
- Johnson DG, Walker CL (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:295-312.
- Jordan-Sciutto KL, Wang G, Murphey-Corb M, Wiley CA (2002) Cell cycle proteins exhibit altered expression patterns in lentiviral-associated encephalitis. *J Neurosci* 22(6):2185-95.
- Kalda A, Eriste E, Vassiljev V, Zharkovsky A (1998) Medium transitory oxygen-glucose deprivation induced both apoptosis and necrosis in cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 240: 21-24.
- Kasten MM, Giordano A (1998) pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ* 5(2):132-40.
- Katzman R (1986) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 314(15):964-73.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493-5.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206-3212.
- King KL, Cidlowski JA (1995) Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem* 58(2): 175-80.

- Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Ueda H, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, Kamada T (1989) Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage-immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience* 31(2):401-11.
- Koh JY, Choi DW (1987) Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Meth* 20:83-90.
- Kornack DR, Rakic P (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10):5768-73.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 15:2027-2033.
- Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A (1998) TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem.* 46(3):327-34.
- Lassen NA (1982) Incomplete cerebral infarction--focal incomplete ischemic tissue necrosis not leading to emolliation. *Stroke* 13(4):522-3
- Lautenschlager M, Onufriev MV, Gulyaeva NV, Harms C, Freyer D, Sehmsdorf U-S, Ruscher K, Moiseeva MV, Arnschwald A, Victorov I, Dirnagl U, Weber JR, Hörtnagl H (2000) Role of nitric oxide in the ethylcholine aziridium (AF64A) model of delayed apoptotic neurodegeneration in vivo and in vitro. *Neuroscience* 97:383-393.
- Lee EYHP, Chang C-Y, Hu N, Wang YCJ, Lai CC, Herrup K, Le WH, Bradley A (1992) Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 349:288-293.
- Lee EYHP, Hu N, Yuan SSF, Cox L, Bradley A, Lee WH, Herrup K (1994) Dual roles of the RB protein in cell cycle regulation und neuron differentiation. *Genes Dev* 8:2008-2021.
- Legrier ME, Ducray A, Propper A, Kastner A. (2001) Region-specific expression of cell cycle inhibitors in the adult brain. *NeuroReport* 12(14):3127-31.

- Lehrmann E, Christensen T, Zimmer J, Diemer NH, Finsen B (1997) Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *J Comp Neurol* 386(3):461-76.
- Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M (1995) Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 146(5):1045-51
- Li Y, Chopp M, Powers C, Jiang N (1997) Immunoreactivity of cyclin D1/cdk4 in neurons and oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:846-856.
- Li Y, Jiang N, Powers C, Chopp M (1998) Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated proteins 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29:1972-1981.
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18:7768-7778.
- Mann DM (1991) The topographic distribution of brain atrophy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 83(1):81-6.
- Martin DP, Ito A, Horigome K, Lampe PA, Johnson EM Jr (1992) Biochemical characterisation of programmed cell death in NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurobiol* 23:1205-1220.
- Matesic DF, Lin RCS (1994) Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain. *J Neurochem* 63(3):1012-20.
- McShea A, Wahl AF, Smith MA (1999) Re-entry into the cell cycle: a mechanism for neurodegeneration in Alzheimer disease. *Medical Hypothesis* 52:525-527.
- Meikrantz W, Schlegel R (1995) Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem* 58(2):160-74.

- Miyazawa K, Himi T, Garcia V, Yamagishi H, Sato S, Ishizaki Y (2000) A role of p27/Kip1 in the control of cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci* 20(15): 5756-5763.
- Miller MW, Nowakowski RS (1988) Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res* 457(1):44-52.
- Molinari CF (1970) Experimental cerebral infarction. I. Selective segmental occlusion of intracranial arteries in the dog. *Stroke* 1(4): 224-231.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116(1):201-11.
- Nagy Z, Esiri MM, Cato AM, Smith AD (1997) Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 94:6-15.
- Nagy Z, Esiri MM, Smith AD (1998) The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 87:731- 739.
- Nath R, Probert A Jr, McGinnis KM, Wang KK (1998) Evidence for activation of caspase-3-like protease in excitotoxin- and hypoxia/hypoglycemia-injured neurons. *J Neurochem* 71(1):186-95.
- Neve RL, McPhie DL, Chen Y (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein(1). *Brain Res* 886(1-2): 54-66.
- Nishikawa R, Furnari FB, Lin H, Arap W, Berger MS, Cavence WK, Huang HJ (1995) Loss of p16INK4 expression is frequent in high grade gliomas. *Cancer Res* 55:1941-1945.
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 18:311-318.
- Nowakowski RS, Hayes NL (2001) Stem cells: the promises and pitfalls. *Neuropsychopharmacology* 25(6):799-804.
- Osuga H, Osuga S, Wang F, Hogan MJ, Slack RS, Hakim AM, Ikeda J-E, Park DS (2000) Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10254-10259.

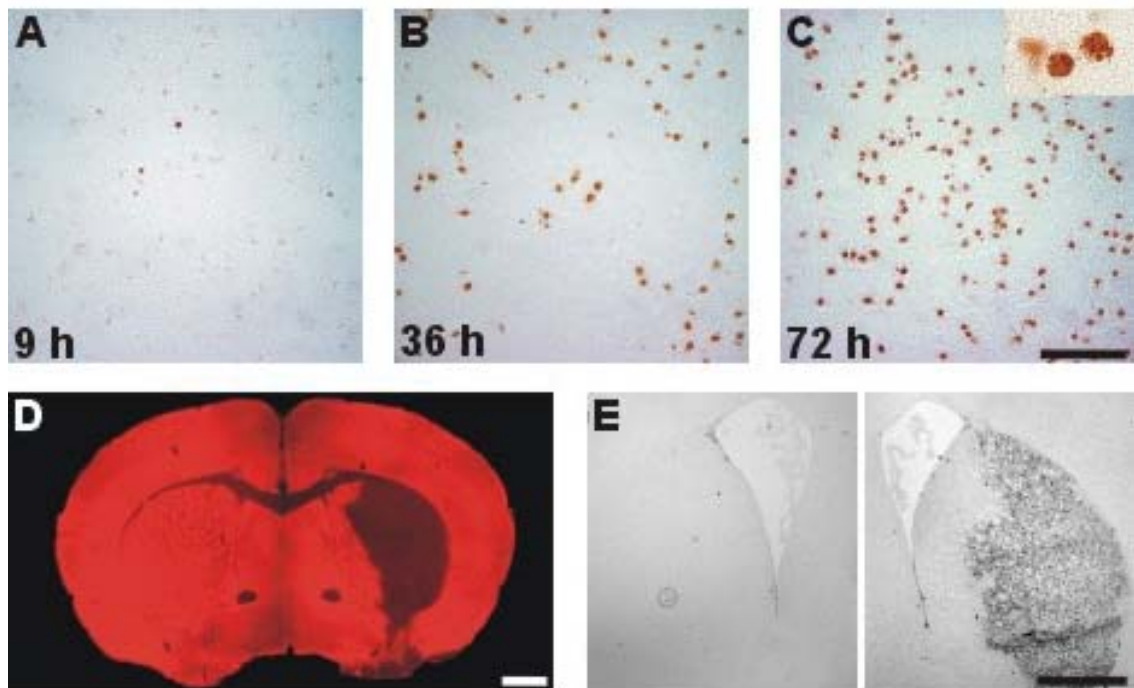
- Padmanabhan J, Park DS, Greene LA, Shelanski ML (1999) Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurosci* 19:8747-8756.
- Palmer TD, Wilhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494.
- Pardee AB (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608.
- Parent JM, Tada E, Fike JR, Lowenstein DH (1999) Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. *J Neurosci* 19:4508-4519.
- Park DS, Farinelli SE, Greene LA (1996) Inhibitors of cyclin-dependent kinases promotes survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *J Biol Chem* 271:8161-8169.
- Park DS, Levine B, Ferrari G, Greene LA (1997a) Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* 17:8975-8983.
- Park DS, Morris EJ, Greene LA, Geller HM (1997b) G1/S cell cycle blockers and inhibitors of cyclin-dependent kinases suppress camptothecin-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* 17:1256-1270.
- Park DS, Morris EJ, Padmanabhan J, Shelanski ML, Geller HM, Greene LA (1998) Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. *J Cell Biol* 143:457-467.
- Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15(2):313-26.
- Poeck K und Hacke W (1998) *Neurologie* 10. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- Puri PL, MacLachlan TK, Levrero M, Giordano A (1999) The intrinsic cell cycle: from yeast to mammals In Stein GS, Baserga R, Giordano A und Denhardt DT. *The molecular basis of cell cycle and growth control*. Wiley-Liss, New York.

- Raina AK, Takeda A, Smith MA (1999) Mitotic neurons: a dogma succumbs. *Exp Neurol* 159: 248-9.
- Rakic P (2002) Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nature Reviews Neuroscience* 3: 65-71.
- Ross ME (1996) Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *Trends Neurosci* 19(2):62-8.
- Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, Dirnagl U (1998) Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 254(2):117-20.
- Sakurai M, Hayashi T, Abi K, Toyama Y, Tabayashi K (2000) Cyclin D1 and cdk4 protein induction in motor neurons after transient spinal cord ischemia in rabbits. *Stroke* 31:200-207.
- Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G (1999) Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 89(4):1367-77.
- Serrano M, Gomez-Lahoz E, DePinho RA, Beach D, Bar-Sagi D (1995) Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science* 267(5195):249-52.
- Sherr CJ (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73:1059-1065.
- Sherr CJ (1994) G1 progression: cycling on cue. *Cell* 79:551-555.
- Small DL, Monette R, Fournier MC, Zurakowski B, Fiander H, Morley P (2001) Characterization of cyclin D1 expression in a rat global model of cerebral ischemia. *Brain Res* 900(1):26-37.
- Stefanis L, Park DS, Friedman WJ, Greene LA (1999) Caspase-dependent and-independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. *J Neurosci* 19:6235-6247.
- Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JFR, Parnavelas JG (1997) Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17:1075-1085.

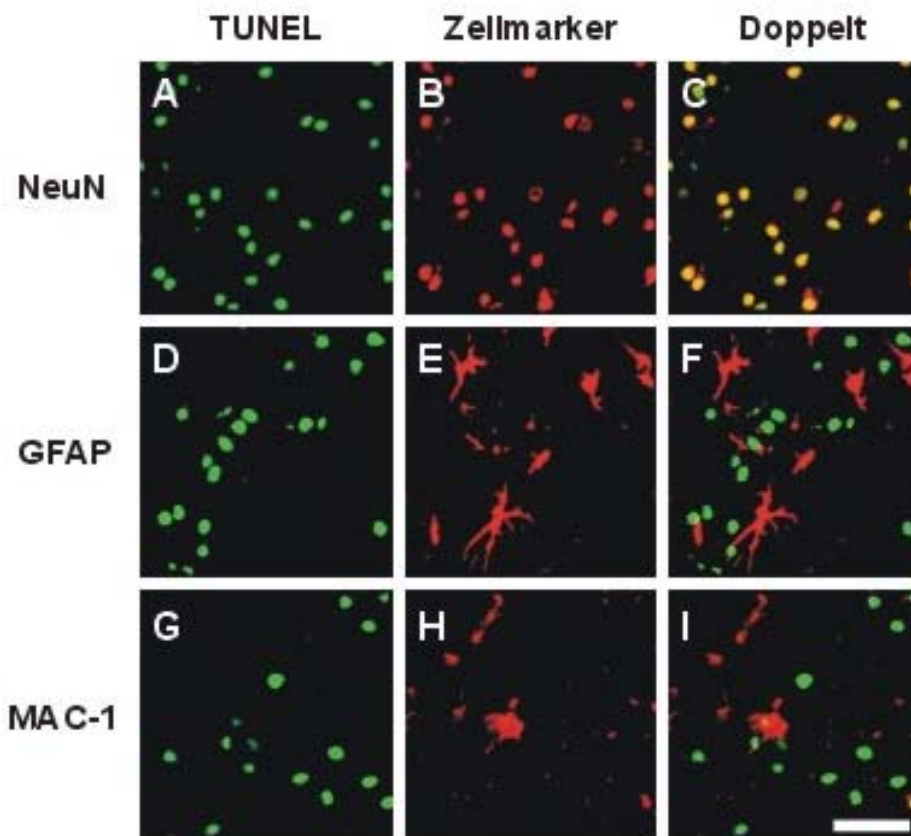
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281(5381):1312-6.
- Timsit S, Rivera S, Ouaghi P, Guischard F, Tremblay É, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M (1999) Increased cyclin D1 in vulnerable neurons in the hippocampus after ischaemia and epilepsy: a modulator of in vivo programmed cell death? *Eur J Neurosci* 11:263-278.
- Tixier-Vidal A (1994) Cell division and differentiation of central nervous system neurons. *Ann N Y Acad Sci* 733:56-67.
- Toyoshima H, Hunter T (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78(1):67-74.
- Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efrid JT, von Deimling A, Louis DN (1996) CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56:150-153.
- Vesely J, Havlicek L, Strand M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L, Leclerc S (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 224:771-786.
- Victor M, Ropper AH (2001) *Principles of Neurology*. 7. Aufl. McGraw-Hill, New York.
- Vidal A, Koff A (2000) Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247:1-15.
- Vincent I, Jicha G, Rosado M, Dickson DW (1997) Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* 17(10):3588-98.
- Watanabe G, Pena P, Shambaugh GE 3rd, Haines GK 3rd, Pestell RG (1998) Regulation of cyclin dependent kinase inhibitor proteins during neonatal cerebella development. *Dev Brain Res* 108:77-87.
- Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.
- Wiessner C, Brink I, Lorenz P, Neumann-Haefelin T, Vogel P, Yamashita K (1996) Cyclin D1 messenger RNA is induced in microglia rather than neurons following transient forebrain ischaemia. *Neuroscience* 72(4):947-58.

- Yang J und Kornbluth S (1999) All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their cdk partners. *Trends Cell Biol* 9:207-210.
- Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K (2001) DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21(8):2661-8.
- Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats (1989) *Stroke* 20: 84-91.
- Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG (1995) What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 7(6):835-42.
- Zindy F, Soares H, Herzog K-H, Morgan J, Sherr CJ, Roussel MF (1997a) Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development. *Cell Growth Diff* 8:1139-1150.
- Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ (1997b) Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15(2):203-11.
- Zindy F, Cunningham JJ, Sherr CJ, Jogal S, Smeyne RJ, Roussel MF (1999) Postnatal neuronal proliferation in mice lacking Ink4d and Kip1 inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13462-7.

9. Atlas der Farbabbildungen



Farbabb. 1, Legende s. Seite 80



Farbabb. 2, Legende s. Seite 80

Farbabb. 1

Verzögerter neuronaler Zelltod im Striatum nach einer 30-minütigen Okklusion der A. cerebri media (MCAo) und Reperfusion.

Mäuse (Stamm SV129) wurden mit Halothan tief anästhesiert. Die A. cerebri media wurde für 30 min mit einem Nylonmonofaden okkludiert. Zelltod wurde an den Gefrierschnitten (10 µm) mittels In Situ-Markierung der nukleären DNA-Fragmentation (TUNEL) evaluiert (A-C, E). Repräsentative mikroskopische Aufnahmen aus dem ischämischen Striatum zeigen einzelne TUNEL-positive Zellen zum Reperfusionszeitpunkt 9 h (A), eine deutliche Zunahme der TUNEL-positiven Zellen zum Reperfusionszeitpunkt 36 h (B) und ein Maximum der Schädigung zum Zeitpunkt 72 h (C). Eine Übersichtsaufnahme der TUNEL-Färbung bestätigt, daß die TUNEL-Reaktivität sich auf das ischämische Striatum beschränkt (E).

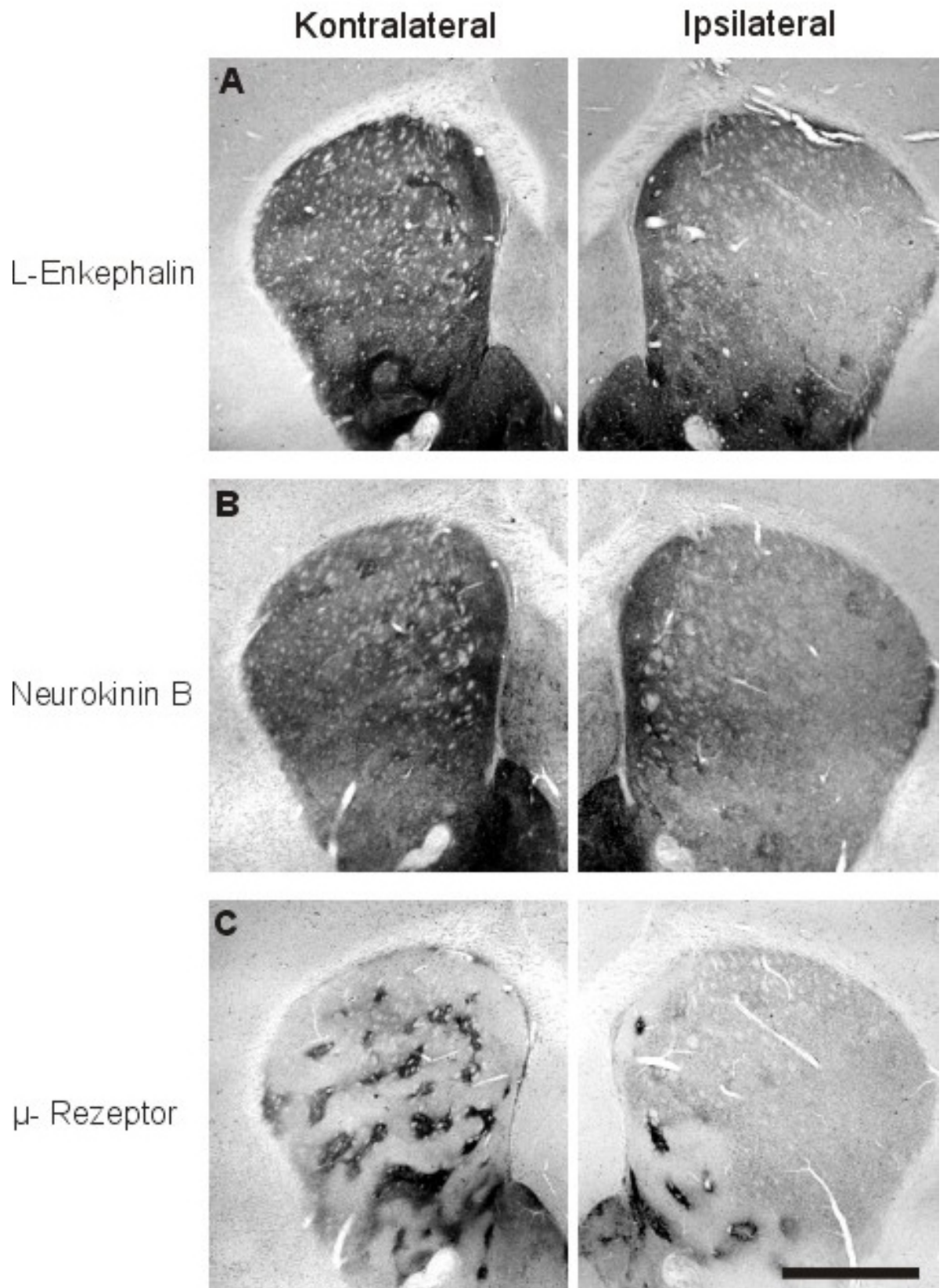
Vibratomschnitte (40 µm) wurden mit dem Antikörper gegen den Ischämie-sensitiven neuronalen Marker MAP2 mit TexasRed als Fluorochromogen immunhistochemisch gefärbt. Die Übersichtsaufnahme zeigte eine selektive Schädigung des ischämischen Striatums (D).

Skalierungsbalken: A-C 30 µm, D-E 1 mm

Farbabb. 2:

Selektiver neuronaler Zelltod im ischämischen Striatum: zum Reperfusionszeitpunkt 72 h nach MCAo wurden TUNEL-positive Zellen (A, D, G, visualisiert mit Fluorescein) mit dem neuronalen Marker NeuN (B), dem astroglialen Marker GFAP (E) und dem mikroglialen Marker MAC-1 (H) doppelgefärbt. Die Zellmarker wurden dabei mit TexasRed visualisiert (B, E, H). Während keine TUNEL-positiven Zelle für GFAP (D-F) oder für MAC-1 (G-I) positiv waren, waren praktisch alle TUNEL-positiven Zellen NeuN-immunreaktiv (A-C).

Skalierungsbalken: 30 µm



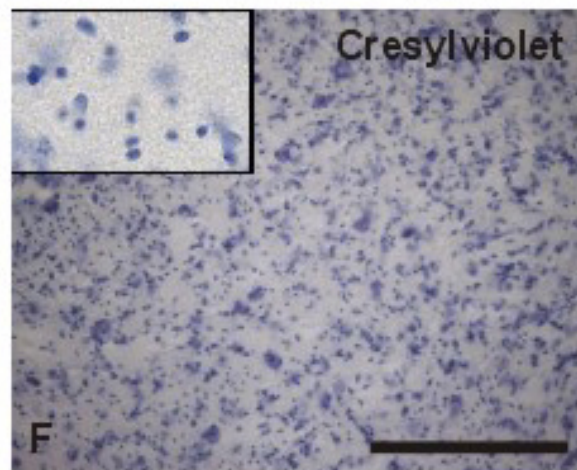
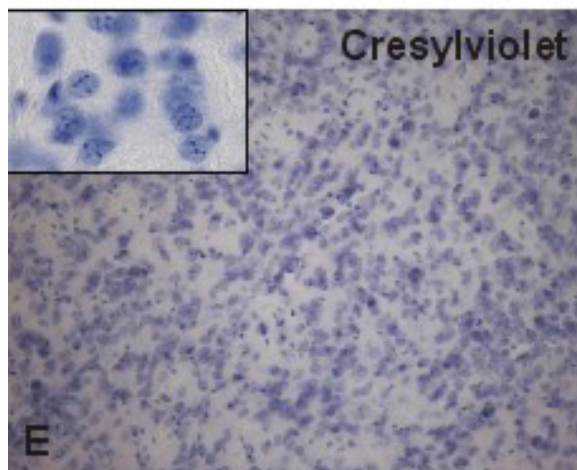
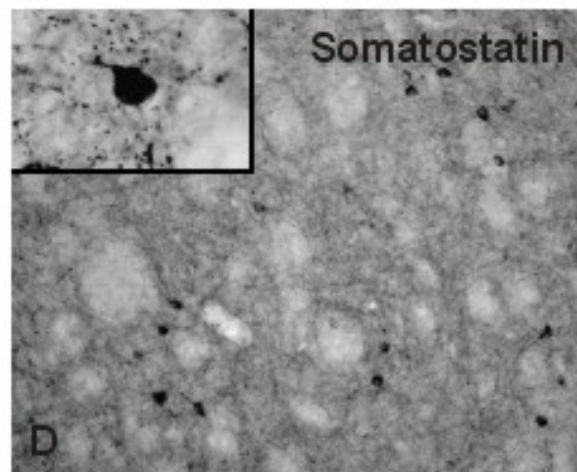
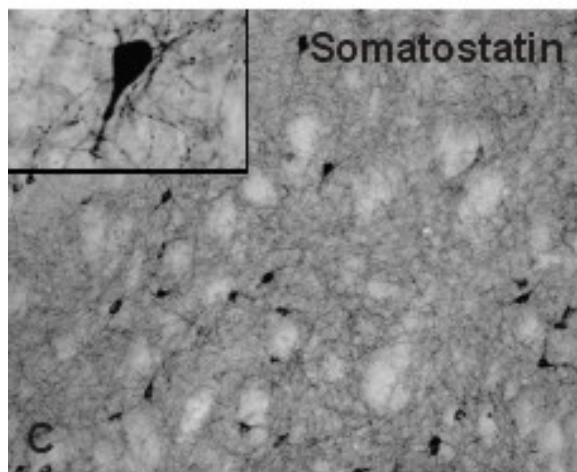
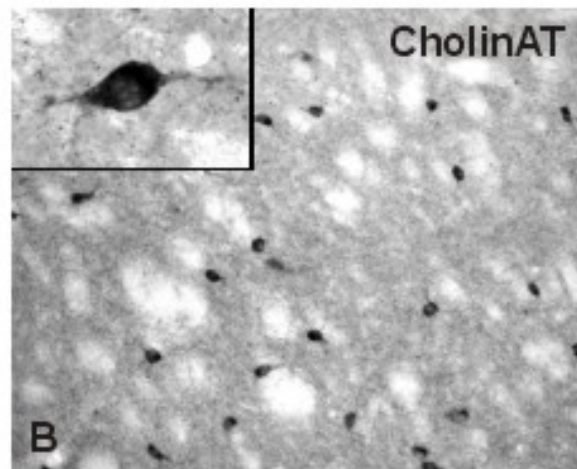
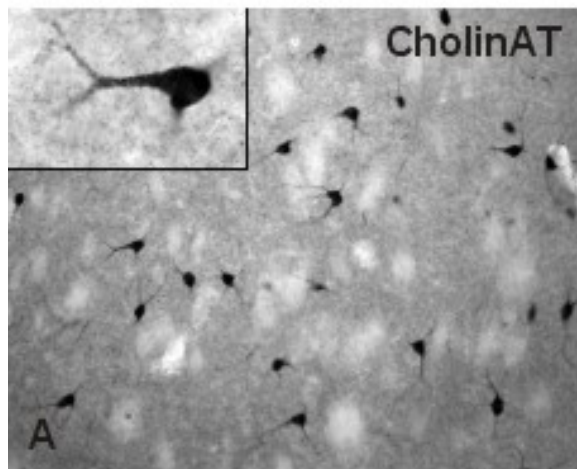
Farbabb. 3:

Untergang von Projektionsneuronen („medium spiny neurons“) im ischämischen Striatum. Vibratomschnitte (40 µm) wurden mit Antikörpern gegen Marker von Projektionsneuronen immunhistochemisch gefärbt. Zum Reperfusionszeitpunkt 72 h nach der 30-minütigen Okklusion der A. cerebri media (MCAo) wurde ein deutlicher Verlust der Immunreaktivität gegen L-Enkephalin (A), Neurokinin B (B) und µ-Opioid-Rezeptor (C) im ischämischen (ipsilateralen) Striatum detektiert. Im Striatum werden Matrix und Striosomen (µ-Opioid-Rezeptor-positiv) unterschieden. Der Verlust der Immunreaktivität gegen den spezifischen striosomalen Marker µ-Rezeptor weist auf die Vulnerabilität von Striosomen gegenüber der 30-minütigen Ischämie hin (C).

Skalierungsbalken: 1 mm.

Kontralateral

Ipsilateral



Farbabb. 4, Legende s. Seite 84

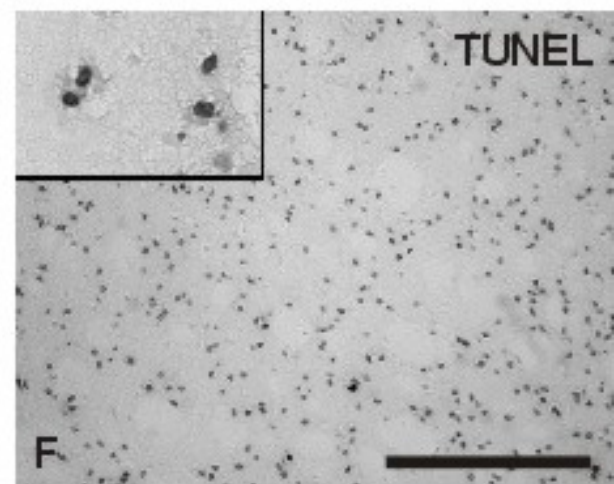
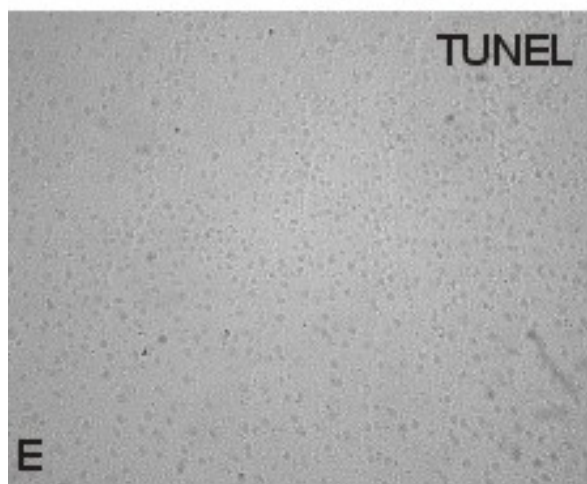
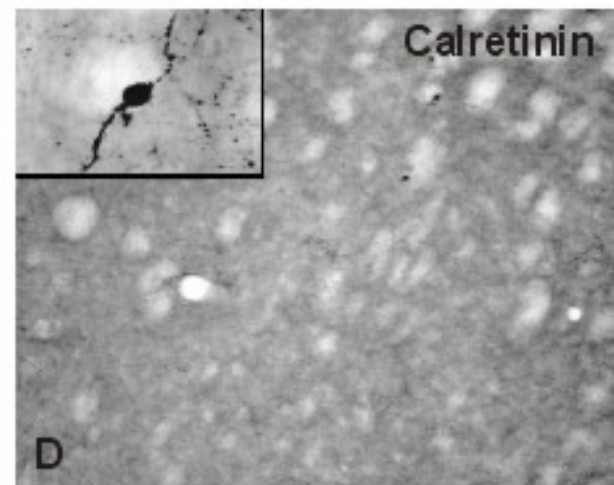
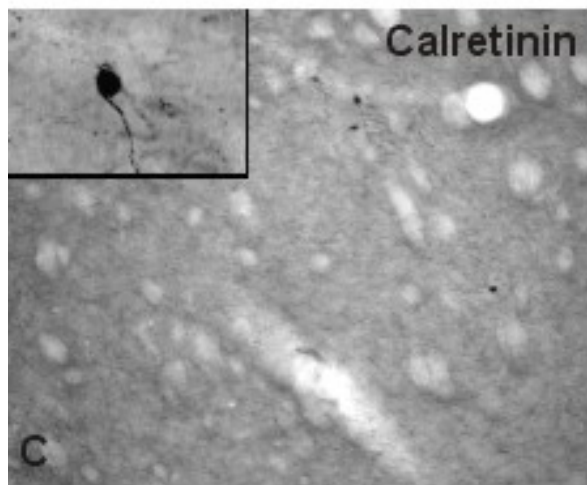
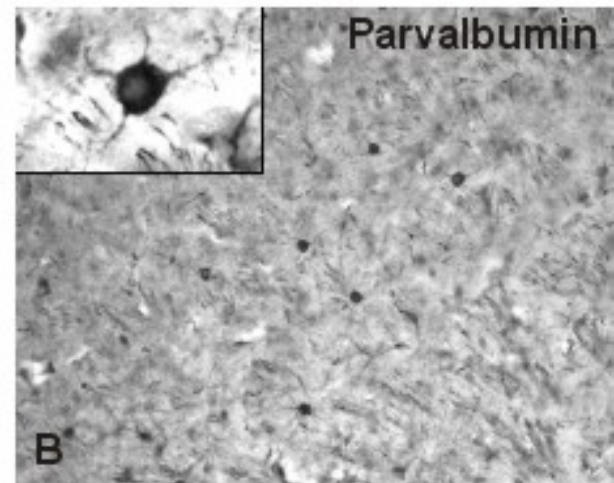
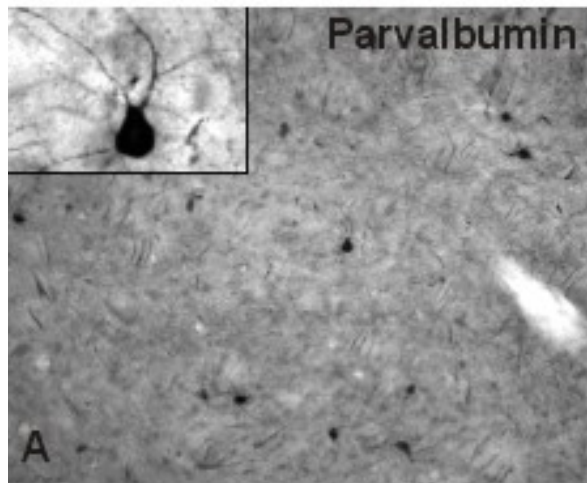
Farbabb. 4:

Striatale Interneurone überleben selektiv nach milder Ischämie. Vibratomschnitte wurden gegen Cholin-Acetyl-Transferase (CholinAT, A-B) und gegen Somatostatin (C-D) immunhistochemisch gefärbt. Benachbarte Schnitte wurden mit Cresylviolett nach Nissl gefärbt (E-F). Repräsentative Abbildungen wurden von den kontralateralen (intakten) Striata (A, C, E) und von ipsilateralen (ischämischen) Striata (B, D, F) angefertigt. Zum Zeitpunkt 72 h nach Okklusion der A. cerebri media (MCAo) überleben im Infarktareal cholinerge (B) und somatostatinerge (D) Neurone den Ischämieschaden .

Skalierungsbalken: 250 μ m

Kontralateral

Ipsilateral



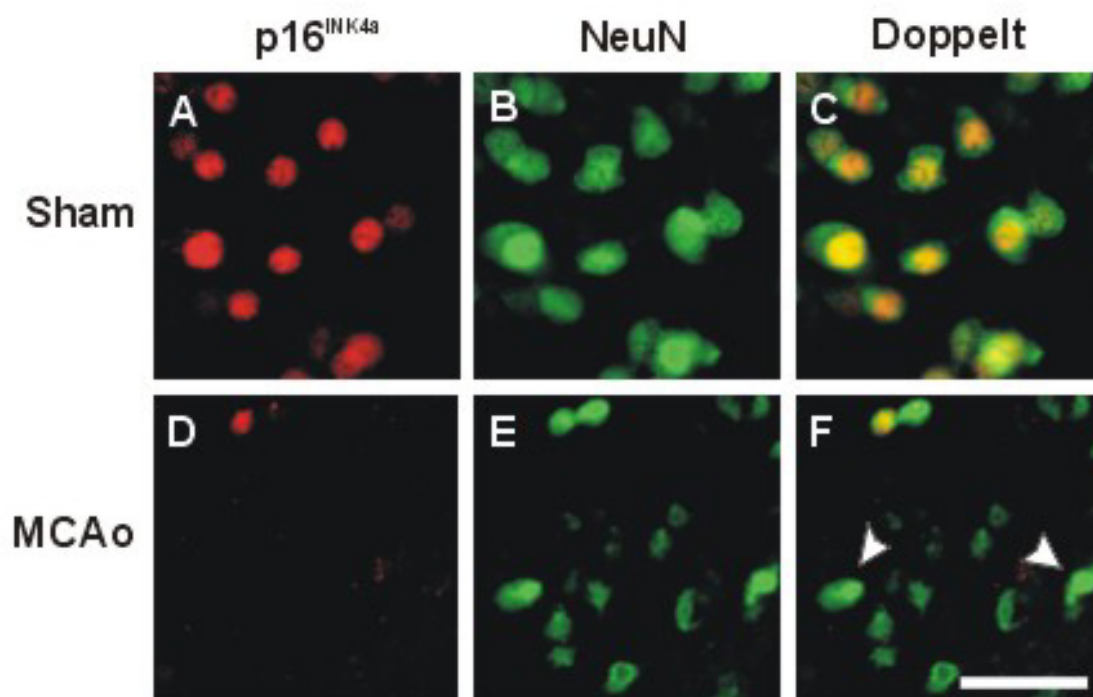
Farbabb. 5, Legende s. Seite 86

Farbabb. 5:

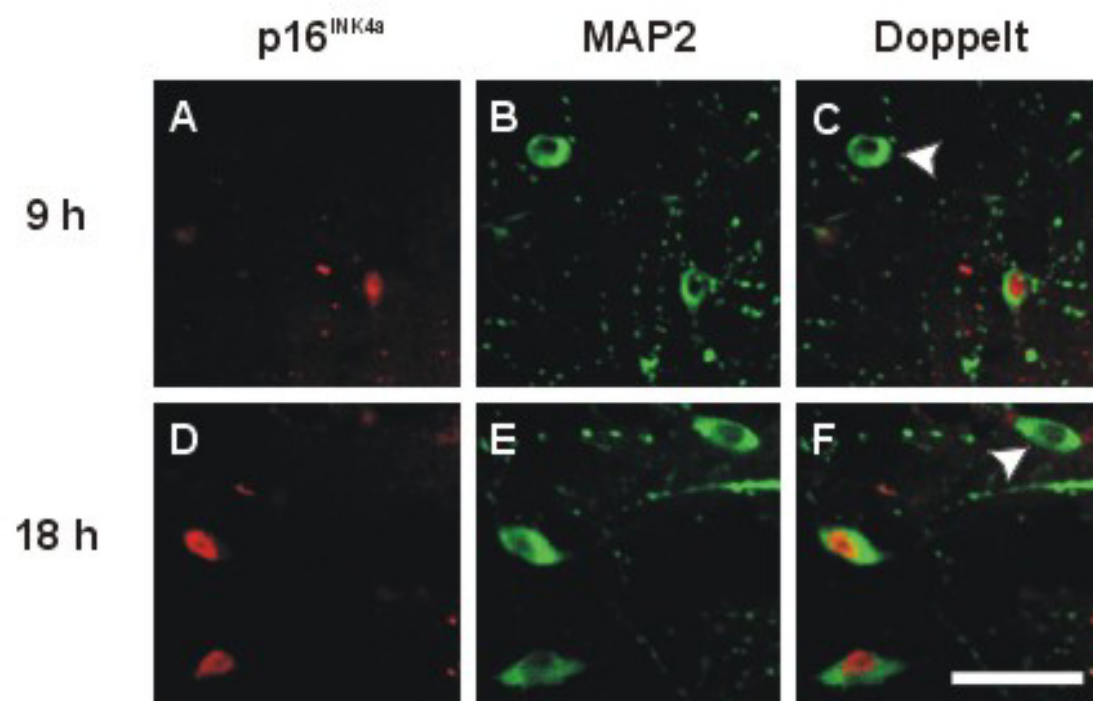
Striatale Interneurone überleben selektiv nach milder Ischämie. Vibratomschnitte (40 μm) wurden gegen Marker für GABAerge Interneurone Parvalbumin (A-B) und Calretinin (C-D) immunhistochemisch gefärbt. Zelltod mittels In Situ-Markierung der nukleären DNA-Fragmentation (TUNEL) evaluiert (E-F). Repräsentative Abbildungen wurden von den kontralateralen (intakten) Striata (A, C, E) und von ipsilateralen (ischämischen) Striata (B, D, F) angefertigt.

Zum Zeitpunkt 72 h nach Okklusion der A. cerebri media (MCAo) überleben im Infarktareal Parvalbumin- (B) und Calretinin-haltige (D) GABAerge Interneurone den Ischämieschaden .

Skalierungsbalken: 250 μm



Farbabb. 6, Legende s. Seite 88



Farbabb. 7, Legende s. Seite 88

Farbabb. 6:

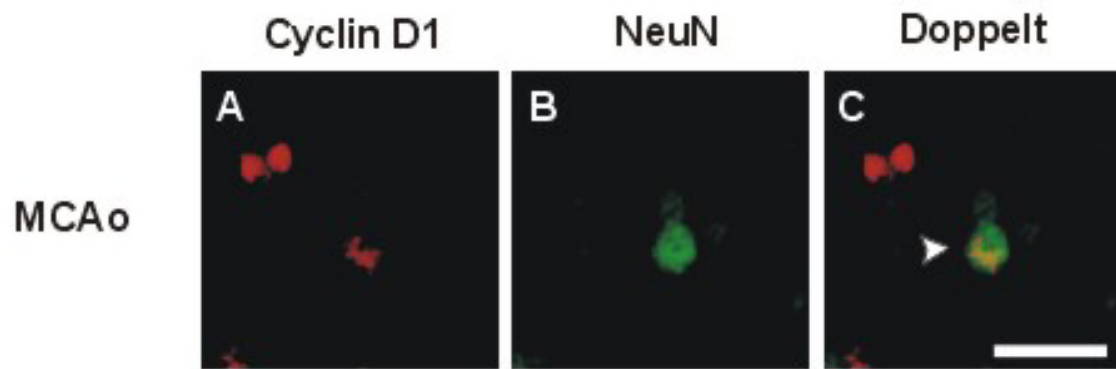
Expression des endogenen CDK-Inhibitors p16^{INK4a} im intakten (A-C) und ischämischen (D-F) Mausstriatum. Immunreaktivität für p16^{INK4a} wurde mit dem Fluorochromogen TexasRed (A, D) und die für den neuronalen Marker NeuN mit dem Fluorochromogen Alexa-488 (B, E) visualisiert. Im intakten Striatum waren alle Neurone p16^{INK4a}-positiv (C). Bereits zum Reperusionszeitpunkt 9h nach Okklusion der A. cerebri media (MCAo) fand sich ein Verlust der p16^{INK4a}-Immunoreaktivität in Neuronen im ischämischen Striatum (D, Pfeile).

Skalierungsbalken: 30 µm

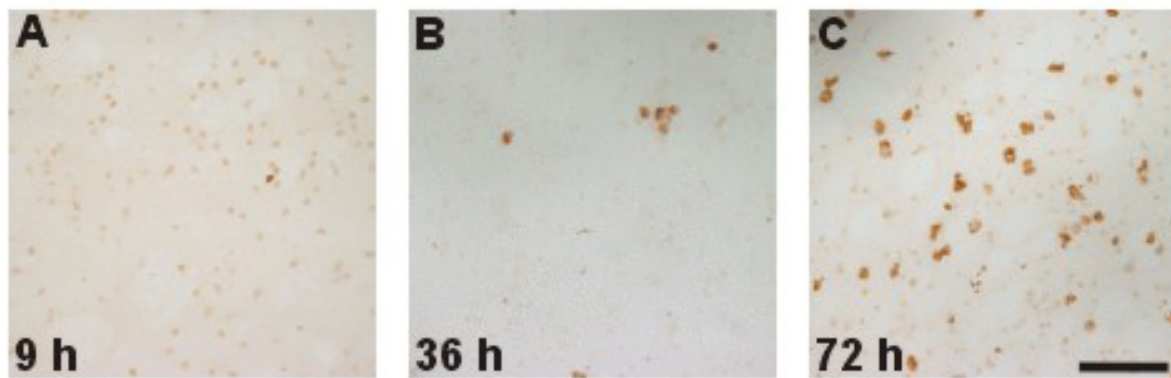
Farbabb. 7:

Verlust von p16^{INK4a}-Immunreaktivität in zytoarchitektonisch intakten Neuronen. Vibratomschnitte (40 µm) wurden gegen p16^{INK4a} gefärbt (A, D) und mit dem nukleären neuronalen Marker MAP2 gegengefärbt (B, E). Immunreaktivität für p16^{INK4a} wurde mit dem Fluorochromogen TexasRed (A, D) und die für den neuronalen Marker NeuN mit dem Fluorochromogen Alexa-488 (B, E) visualisiert. Doppelfärbungen von p16^{INK4a} und dem Ischämie-sensitiven neuronalen Marker MAP2 zu den Zeitpunkten 9 h (A-C) und 18 h (D-F) zeigten eine Herunterregulierung von p16^{INK4a} in zytoarchitektonisch noch weitgehend intakten (MAP2-positiven) Neuronen (C, F, Pfeile).

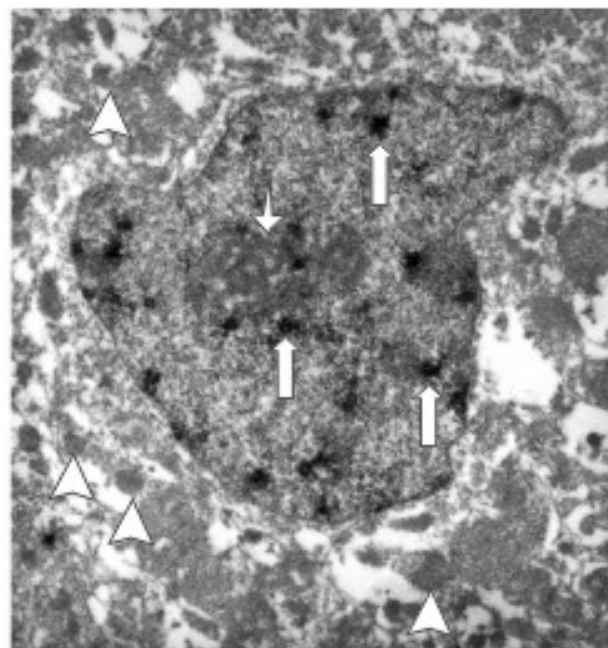
Skalierungsbalken: 30 µm



Farbabb. 8, Legende s. Seite 90



Farbabb. 9, Legende s. Seite 90



Farbabb. 10,
Legende s.S. 90

Farbabb. 8:

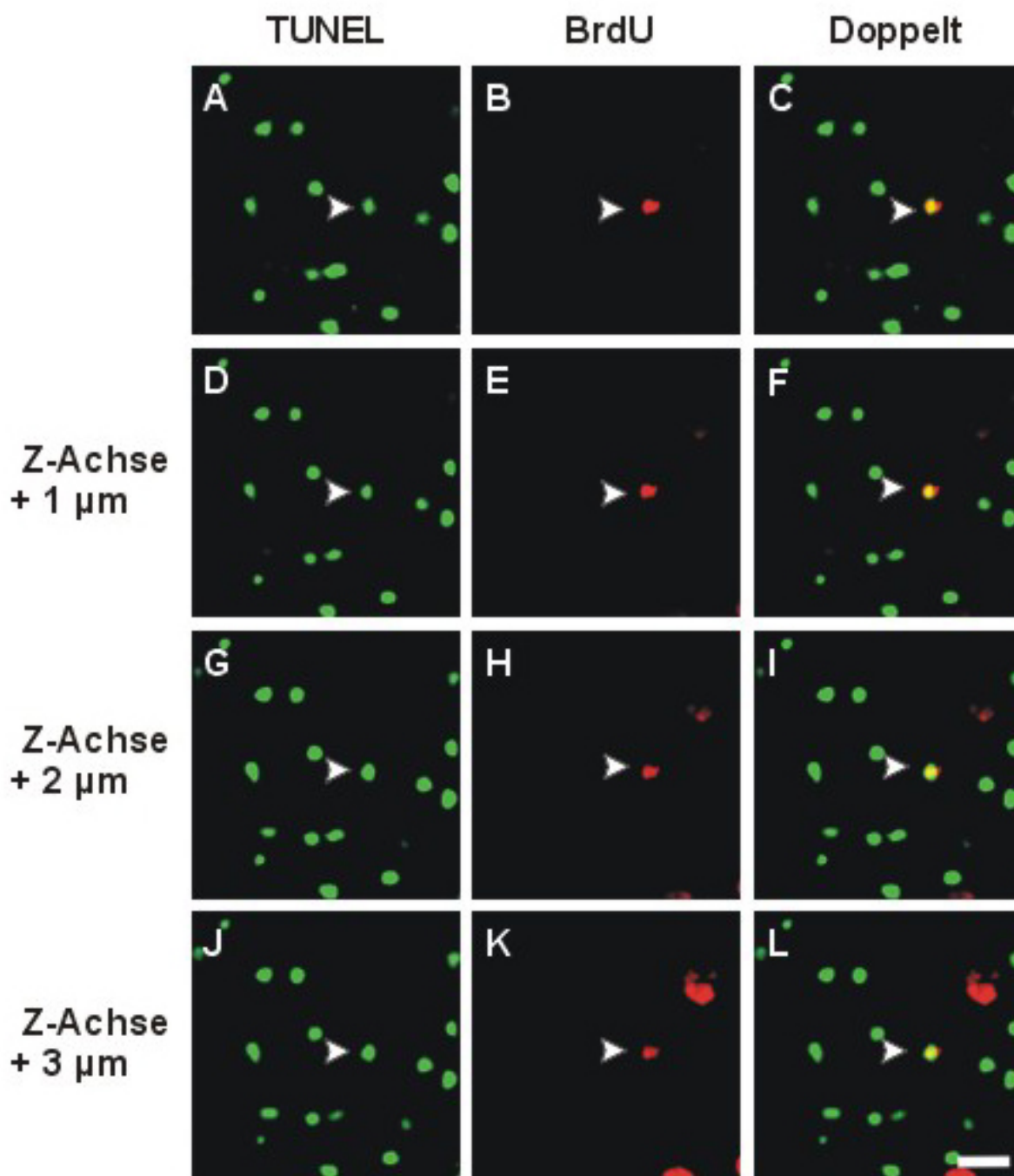
Nukleäre Expression von Cyclin D1 in Neuronen des ischämischen Striatums. Vibratomschnitte (40 µm) wurden gegen Cyclin D1 gefärbt (visualisiert mit TexasRed, A) und mit dem nukleären neuronalen Marker NeuN gegengefärbt (visualisiert mit Alexa-488, B). Es fand sich keine Cyclin D1- Immunreaktivität im intakten Striatum. 48 h nach MCAo wurde hingegen eine nukleäre Expression von Cylin D1 in einzelnen Neuronen detektiert (C, Pfeil). Skalierungsbalken: 30 µm

Farbabb. 9:

Zeitverlauf der Immunreaktivität gegen den Marker der S-Phase des Zellzyklus 5-Bromo-2'-Desoxy-Uridin (BrdU) im ischämischen Striatum. BrdU wird als Thymidinanalogon in die replizierende DNA eingebaut. BrdU wurde mittels einer osmotischen Minipumpe über den gesamten Zeitraum der Reperfusion kontinuierlich appliziert. Kryostat- und Vibratomschnitte wurden mit 2 N HCl vorbehandelt und dann gegen BrdU mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen immungefärbt. Zum Reperfusionszeitpunkt 9 h wurden keine BrdU-positiven Zellen detektiert (A). Die ersten BrdU-markierten Zellen erschienen zum Zeitpunkt 36 h (B); ihre Anzahl nahm dann bis zum Zeitpunkt 72 h kontinuierlich weiter zu (C). Skalierungsbalken: 30 µm

Farbabb. 10:

Elektronenmikroskopischer Nachweis von BrdU-positiven Neuronen. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Vibratomschnitte (60 µm) gegen BrdU mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen immungefärbt. Die Elektronenmikrographie zeigt eine Zelle mit mehreren elektronenmikroskopisch dichten osmiophilen Granula (große Pfeile) im Nukleus, welche der BrdU-Färbung entsprechen. Die Zelle hat typische morphologische Charakteristika eines Neurons: zentraler Nukleus mit einem prominenten Nukleolus (kleiner Pfeil) sowie multiple zytoplasmatische Vesikeln (Pfeilspitzen). Originalvergrößerung X 11.000

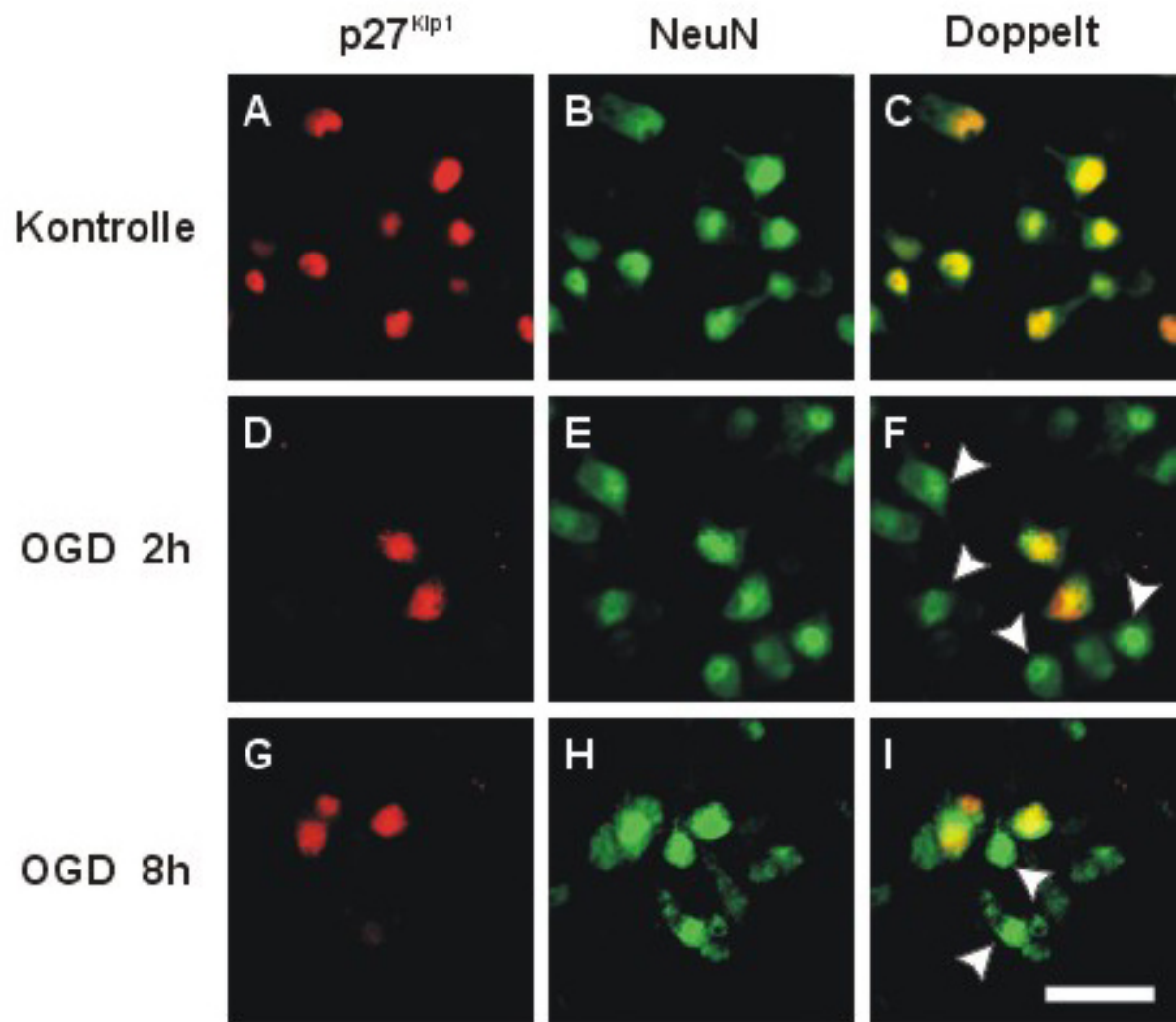


Farbabb. 11, Legende s. Seite 92

Farbabb. 11:

TUNEL-BrdU-Doppelfärbung im ischämischen Striatum. An den Kryostatschnitten (10 µm) wurde zuerst eine In Situ-Markierung der nukleären DNA-Fragmentation (TUNEL) durchgeführt und mit Fluorescein visualisiert (A, D, G, J). Die Schnitte wurden dann mit 2 N HCl vorbehandelt und gegen BrdU immungefärbt (visualisiert mit TexasRed, B, E, H, K). Zum Zeitpunkt 72 h waren ca. 1% der TUNEL-positiven Zellen für den S-Phase-Marker BrdU immunreaktiv (C, Pfeil). Die sog. Z-Serien, d.h. konfokale Mikrophotographien im Abstand von 1 µm in der Achse senkrecht zum Schnitt, bestätigten die Kolokalisation der beiden Marker innerhalb derselben Zelle (F, I, L, Pfeil).

Skalierungsbalken: 30 µm.

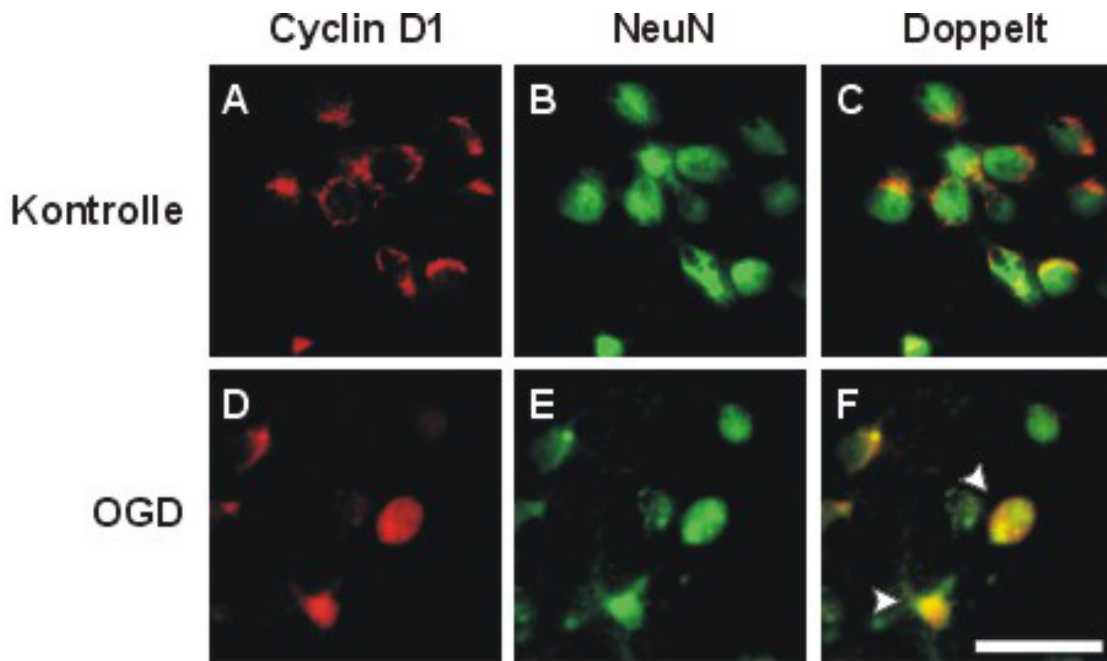


Farbabb. 12, Legende s. Seite 94

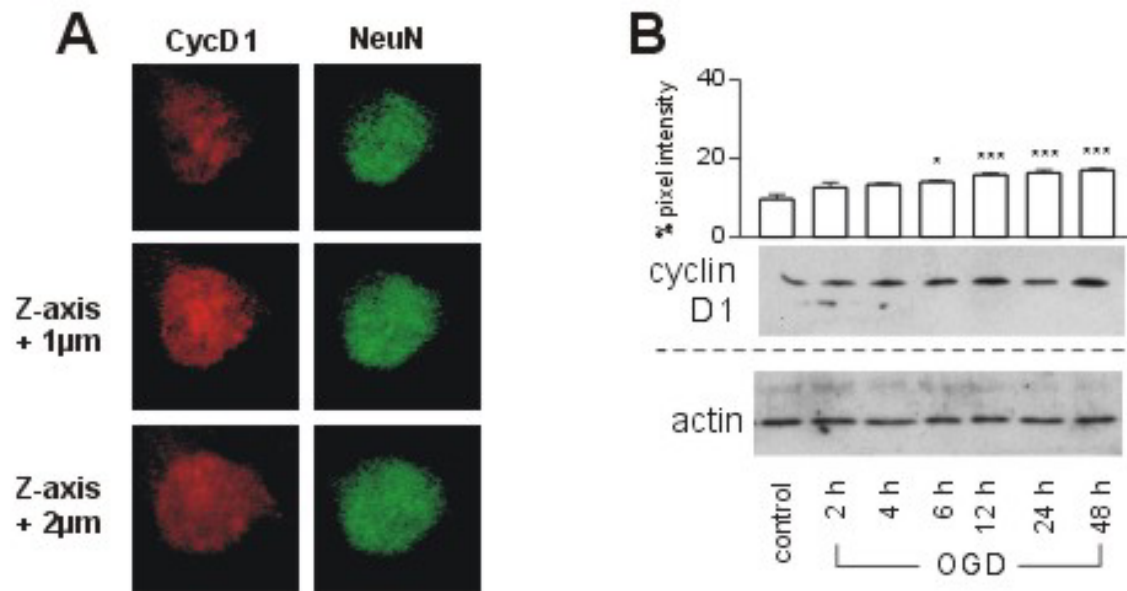
Farbabb. 12:

Expression in Kultur des endogenen CDK-Inhibitors p27^{Kip1} in der intakten kortikalen neuronalen Kultur (A-C) sowie nach Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) (D-I). Immunreaktivität für p27^{Kip1} wurde mit TexasRed (A, D, G) und die für den neuronalen Marker NeuN mit Alexa-488 (B, E, H) visualisiert. In der intakten primären Zellkultur waren alle Neurone p27^{Kip1}-positiv (C). Bereits 2h nach OGD fand ein Verlust der p27^{Kip1}-Immunreaktivität in Neuronen statt (D, Pfeile), welcher sich noch zum Zeitpunkt von 8 h nach OGD nachweisen ließ (I, Pfeile).

Skalierungsbalken: 30 μ m



Farbabb. 13, Legende s. Seite 95



Farbabb. 14, Legende s. Seite 95

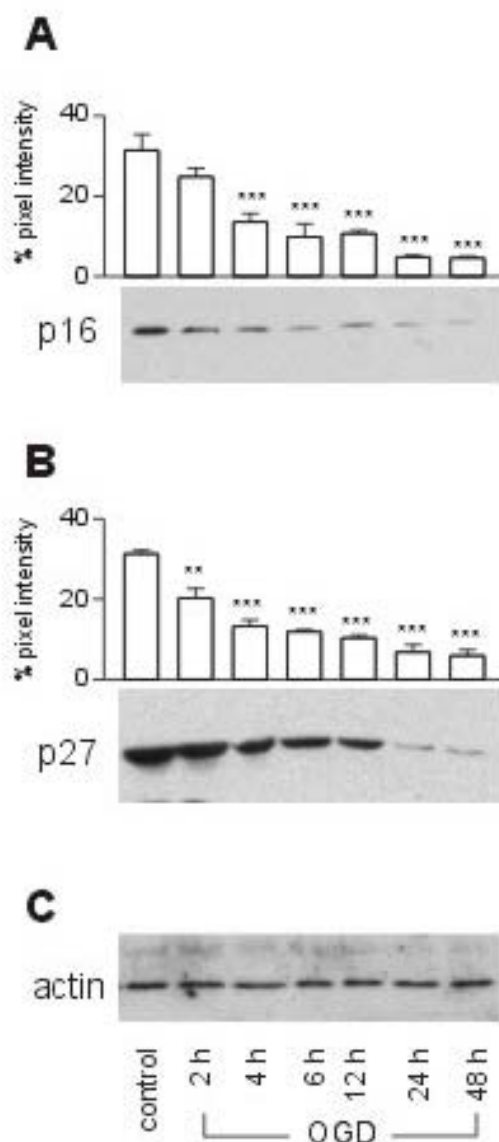
Farbabb. 13:

Expression von Cyclin D1 in neuronalen Zellen in Kultur. Immunreaktivität für Cyclin D1 wurde mit TexasRed visualisiert (A, D); der neuronale nukleäre Marker NeuN wurde mit Alexa-488 visualisiert (B, E). Die Doppelfärbung für Cyclin D1 und NeuN demonstriert, daß Cyclin D1 unter Kontrollbedingungen ausschließlich zytoplasmatisch exprimiert wird (A-C). 4 h nach Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) war Cyclin D1 hochreguliert; die Cyclin D1-Immunreaktivität wurde dabei im Nukleus nachgewiesen (D-F).

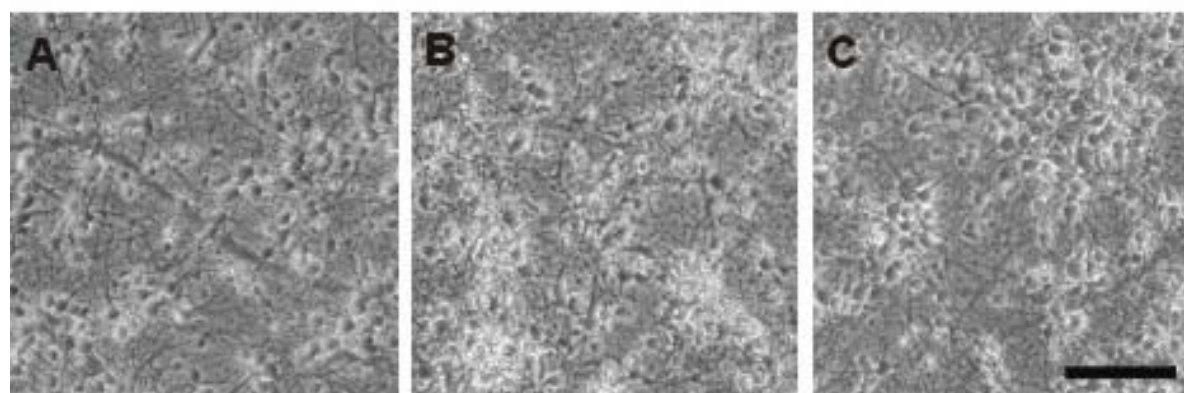
Skalierungsbalken: 30 µm

Farbabb. 14:

*Hochregulierung und nukleäre Lokalisation von Cyclin D1 in Neuronen nach Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). A: Konfokale Abbildungen der Cyclin D1-NeuN-Doppelfärbung in Abständen von 1 µm (sog. Z-Serien) bestätigten die nukleäre Lokalisation von Cyclin D1. B: Western blots zeigten eine Hochregulation von Cyclin D1. Zur semiquantitativen Analyse wurden die Blots digitalisiert und die Intensität der einzelnen Banden mit Hilfe eines speziellen Programms (Scion Image Software) quantifiziert. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.*



Farbabb.15. Legende s. Seite 98



Farbabb.16. Legende s. Seite 98

Farbabb. 15:

*Herunterregulierung der endogenen CDK-Inhibitoren p16^{INK4a} und p27^{Kip1} in Zellkultur nach Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). Zelllysate wurden einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen, die Membranen wurden anschließend gegen p16^{INK4a} (A) und p27^{Kip1} (B) immungefärbt. β -Aktin diente dabei als interne Kontrolle (C). Zur semiquantitativen Analyse wurden die immungefärbten Membranen digitalisiert und die Intensität der einzelnen Banden mit Hilfe des Scion Image-Programmes bestimmt. Eine deutliche Herunterregulierung von p16^{INK4a} wurde 4 h (A) und von p27^{Kip1} 2 h (B) nach Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) detektiert. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.*

Farbabb. 16:

Der synthetische CDK-Inhibitor Olomoucine schützt primäre neuronale Zellkultur vor Sauerstoff-Glukose-Deprivation (OGD). Für OGD wurden die Kulturen für 90 min in der ausbalanzierten Glukose-freien Salzlösung in die Hypoxiekammer mit Sauerstoffpartialdruck $pO_2 < 2$ mmHg plaziert. A: Die Phasenkontrast-Mikrographie zeigt kortikale Neurone in der intakten Zellkultur. B: 24 h nach Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) und Vorbehandlung mit Vehikel wurde ein deutlicher Zellschaden lichtmikroskopisch festgestellt. C: Durch eine Vorbehandlung mit 10 μ M Olomoucine wurde der Zellschaden nach Sauerstoff-Glukose-Entzug reduziert.

Skalierungsbalken: 70 μ m.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. U. Dirnagl für die Überlassung des Themas, sein persönliches Interesse am Fortgang der Arbeit sowie meine persönliche Unterstützung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Endres möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung danken. In enger Zusammenarbeit und konstruktiver Diskussion half er mir unermüdlich. Besonders in schwierigen Teilen der Arbeit nahm er sich stets die Zeit zu tatkräftiger Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt meinen ehemaligen Kommilitonen und jetzigen Arbeitskollegen Frau K. Gertz und Herrn C. F. Harms für die vorbildliche kooperative und kollegiale Zusammenarbeit im Labor.

Frau Prof. Dr. H. Hörtnagl (Institut für Pharmakologie, Charité) möchte ich aufrichtig für die vielfältige Unterstützung bei der Durchführung des Projektes danken.

Herrn Prof. Dr. med. W. Brück (Institut für Neuropathologie, Charité) danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie für stets konstruktive Diskussion und Kritik. Herrn Dr. ret. nat. L. Hauck (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) danke ich für seine Unterstützung bei radioaktiven Messungen der Enzymaktivität.

Herrn Prof. Dr. P.G. Bhide (Harvard Medical School) möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung während meines dreimonatigen Aufenthaltes an der Harvard-Universität in Boston danken.

Für kritische Diskussion der Befunde danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Caviness (Harvard Medical School), Prof. Dr. M.A. Moskowitz (Harvard Medical School), Prof. Dr. R. Nowakowski (New Jersey Medical School) und Priv.-Doz. G. Kempermann (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin).

Nicht zuletzt gilt mein aufrichtiger Dank Herrn Dr. K. Kapinya, der mir bei allen Fragen stets behilflich war.

LEBENS LAUF

Name Juri Katchanov
 Geburtsdatum und –ort 15.10.1974 in Moskau
 Familienstand ledig

Beruflicher Werdegang

2001- bis dato Arzt im Praktikum in der Abteilung für Experimentelle Neurologie, Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Charité als Forschungsstipendiat der Humboldt-Universität zu Berlin

Ausbildung

1999- 2001 Medizinische Fakultät der Humboldt- Universität zu Berlin
 1997- 1998 University College London Medical School
 1993- 1997 Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin
 1990- 1993 Marie- Curie- Gymnasium, Berlin
 1991- 1992 Mathematikstudium für Schüler an der Humboldt- und Freien Universität Berlin

Promotion

1999- bis dato Experimentelle Untersuchungen zur neuronalen Fehlregulation des Zellzyklus beim Schlaganfall. Abteilung für Experimentelle Neurologie, Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Charité (Doktorvater: PD Dr.med. M. Endres)

Forschungsaufenthalte im Ausland

1999 Developmental Neurobiology Lab, Harvard Medical School (Direktor: Prof. Dr. V.C. Caviness)

Klinische Auslandsaufenthalte

2000 Downtown Medical Center, State University of New York
 1998 Middlesex Hospital, University of London
 1996 Haddassah Medical Center, Hebrew University Jerusalem

Prüfungen

2001 Ärztliche Prüfung (Gesamtnote: sehr gut)
 2001 III. Med. Staatsexamen (2,0), Berlin
 1999 II. Med. Staatsexamen (1,0), Berlin
 1997 I. Med. Staatsexamen (2,0), Berlin

1995 Physikum (1,0), Berlin

1993 Abitur (1,2)

Stipendien

2001- bis dato Forschungsstipendium der Humboldt- Universität zu Berlin

1996- 2001 Studienstiftung des deutschen Volkes

1999 Auslandsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

1997- 1998 Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD)

Lehrerfahrung

2002- bis dato Dozent im Kurs der neurologischen Untersuchung

2001- 2002 Vorlesungsassistent für Neurologie (Prof.K.M. Einhäupl), Universitätsklinikum Charité

1996-bis dato Dozent für Physiologie und Anatomie an der Krankenschwesterhelferschule, Malteser Hilfsdienst e.V.

1995- 1997 Tutor für makroskopische Anatomie, Freie Universität Berlin

Projekte/ Drittmittelprojekte (gefördert durch DFG EN343/4-1 , EN 343/6-1, Hermann und Lilly Schilling Stiftung)

- 1) Zellzyklus und zerebrale Ischämie (EN 343/4-1 und 6-1, Kollaboration mit Prof Dr. Bhide, Harvard Medical School)
- 2) Selektiver neuronaler Zelltod im Striatum (Kollaboration Prof. Veh, Inst. für Anatomie der Charité)
- 3) Neurogenese nach bakterieller Meningitis (Kollaboration mit Prof. Weber)
- 4) Transplantation humaner neuronaler Prekursoren zur Behandlung der zerebralen Ischämie (Kollaboration mit PD Dr. Kupsch, Klinik für Neurologie, Campus Virchow)
- 5) Reparatur von DNA-Punktmutationen nach zerebraler Ischämie (Kollaboration mit Prof. Jaenisch, MIT, Cambridge, USA)

Publikationen

Originalarbeiten

- Katchanov J**, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Brück W, Hörtnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M (2001) Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci* 21: 5045-5053.
- Harms C, **Katchanov J**, Hauck L, Herwig U, Engel F, Dirnagl U, Hörtnagl H, Endres M (2002) Loss of cyclin dependent kinase inhibitors as an early event of neuronal apoptosis induced by ethylcholine aziridium. *In Vorbereitung*.
- Katchanov J**, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Dirnagl U, Brück W, Veh RW, Endres M (2002) Specific neuronal vulnerability following mild focal brain ischaemia in the mouse. *In Vorbereitung*.
- Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, **Katchanov J**, Freyer D, Kapinya K, Herwig U, Megow D, Dirnagl U, Weber JR, Hörtanagl H (2001) Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration *J Neurosci* 21:2600- 2609.
- Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, **Katchanov J**, Dirnagl U, Szabo C, Endres M. (2001) Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke *Int J Mol Med* 7:255-260.
- Hoffmann O, Klingebiel R, Braun JS, **Katchanov J**, Valdueza JM (2002) Diagnostic pitfall: atypical cerebral venous drainage via the vertebral venous system. *AJNR Am J Neuroradiol* 23(3):408-11.
- Isaev NK, Stelmashook EV, Dirnagl U, Andreeva NA, Manuhova L, Vorobjev VS, Sharonova IN, Skrebitsky VG, Victorov IV, Katchanov J, Weih M, Zorov DB (2002) Neuroprotective effects of the antifungal drug clotrimazole. *Neuroscience* 113(1):47-53.
- Kapinya K, Herwig U, Harms CF, Bley K, **Katchanov J**, Dirnagl U, Hörtnagl H (2002) Role of NAD(P)H:Quinone oxydoreductase in the progression of neuronal cell death in vitro and following cerebral ischemia in vivo. *Zur Publikation eingereicht*.

Abstracts

- Katchanov J**, Gertz K, Harms C, Priller J, Hirt L, Waeber C, Wiegand F, Brück W, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M (2000) Loss of p16 and subsequent S-Phase re-entry attempt following mild focal ischemia. *Soc. Neurosc. Abstr.* 26
- Harms C, **Katchanov J**, Gertz K, Bhide PG, Dirnagl U, Hörtnagl H, Endres M (2000) Cell cycle re-entry induces neuronal apoptosis after mild oxygen- glucose-deprivation or ethycholine aziridinium (AF64A) in vitro. *Soc. Neurosc. Abstr.* 26
- Endres M, **Katchanov J**, Harms C, Gertz K, Moskowitz MA, Bhide PG, Dirnagl U (2000) Fehlregulation des Zellzyklus und neuronaler Zelltod. *Akt Neurol* 27 (Suppl I)
- Endres M, **Katchanov J**, Harms C, Gertz K, Hauck L, Hörtnagl H, Bhide PG, Dirnagl U (2001) Loss of p16 and subsequent S-Phase re-entry attempt following mild focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Met* 21 Suppl 1
- Endres M, Biniskiewicz D, Lipski A, **Katchanov J**, Dirnagl U, Jaenisch R A role for uracil DNA glycosylase (UDG) during cerebral ischemia (2001) *Soc. Neurosc. Abstr.* 27
- Endres M, Biniskiewicz D, Lipski A, **Katchanov J**, Dirnagl U, Jaenisch R DNA Reparatur und zerebrale Ischämie (2001) *Akt Neurol* 28 (Suppl I)

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, daß ich die vorliegende Doktorschrift ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe und daß die Doktorschrift von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Berlin, den